

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología



SELECCIÓN DE POSIBLES INHIBIDORES DE FABP4:

**EFFECTOS EN LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA DE
MONOCITOS/MACRÓFAGOS Y EN LAS INTERACCIONES
MACRÓFAGO-ADIPOCITO**

Aránzazu Isabel Rodríguez Sanz

Madrid, 2016

**Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**



SELECCIÓN DE POSIBLES INHIBIDORES DE FABP4:
EFFECTOS EN LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA DE
MONOCITOS/MACRÓFAGOS Y EN LAS INTERACCIONES
MACRÓFAGO-ADIPOCITO

Memoria presentada por **Aránzazu Isabel Rodríguez Sanz**, licenciada en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor.

Directora: **Dra. Teresa Bellón Heredia**
Director: **Dr. Rafael Selgas Gutiérrez**
Tutor: **Dr. Jesús Page Utrilla**

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz



Dra. **Teresa Bellón Heredia**, Investigadora de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario la Paz, el Dr.**Rafael Selgas Gutiérrez**, Jefe del Servicio de Nefrología del Hospital universitario la Paz y el Dr. **Jesús Page Utrilla** Profesor Titular en la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Doña **Aránzazu Isabel Rodríguez Sanz**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: "**Selección de posibles inhibidores de FABP4: Efectos en la actividad proinflamatoria de monocitos/macrófagos y en las interacciones macrófago/adipocito**", que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a

Fdo. Dra. Teresa Bellón
Directora de Tesis

Fdo.Dr.Rafael Selgas
Director de Tesis

Fdo. Dr. Jesús Page
Tutor académico

Esta Tesis ha sido realizada en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid, gracias a los proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI09/00641), el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2010-19867), el Instituto Reina Sofía de Investigación en Nefrología, la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo y Baxter (proyecto extramural).

A mis padres

A mi hermano

A Juanma

*" Pon tu corazón, mente, intelecto
y alma incluso en tus actos más pequeños*

Ese es el secreto del éxito"

-Swami Sivananda-

Agradecimientos

Nunca imaginé que llegaría el día de entregar mi tesis doctoral y poder escribir unas líneas para agradecer a tantas personas que incondicionalmente me habeis ayudado y apoyado en todo este camino.

En primer lugar, quería agradecer a la Dra. Teresa Bellón la oportunidad que me ofreció de poder formar parte de su grupo. Muchísimas gracias Teresa por iniciarme en el mundo de la investigación y por darme tantos buenos consejos de ciencia pero también de la vida. Gracias de verdad por guiarme y ayudarme en todo momento con la mayor disponibilidad y cariño.

Asimismo, quiero agradecer a mi codirector el Dr. Rafael Selgas por facilitar el desarrollo de esta Tesis y ser un referente continuo. Gracias también a todos los miembros del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario La Paz por su dedicación e interés mostrado en nuestro trabajo y por facilitarnos las muestras de los pacientes.

Me gustaría agradecerle a mi tutor, el Dr. Jesús Page, su interés en revisar la Tesis minuciosamente y que me ayudara a mejorar el manuscrito con algunas sugerencias de cambios.

Quisiera agradecer a la Unidad de química orgánica de la Universidad Alcalá en especial a Ramón, Juanjo y Patri por la síntesis de todos los compuestos expuestos en esta tesis y su estrecha colaboración en muchas de las tareas realizadas, así como su completa disposición a resolver cualquier duda o problema que se haya podido plantear.

A D. Manuel Rodríguez Puyol, D. Diego Rodríguez Puyol y Dña Mercedes Giera por la ayuda en el desarrollo experimental y cualquier cuestión relacionada.

A mis queridos compañeros de laboratorio, los que ya no están y los que siguen estando porque todos y cada uno de vosotros me habeis ayudado y teneis un hueco muy especial en mi corazón.

A Esther y Salva, siempre recordaré sus enseñanzas y el buen rollo que teníamos en el labo, además de trabajar que risas y que bien lo pasábamos. Gracias también a Aurora, Águeda, Ana, Marcial, Elena y Jose que aunque estuvieron en el labo menos tiempo me contagiaron su gran entusiasmo y sus ganas de aprender.

A mi compi VIR VIR con mayúsculas, gracias de verdad por ser mi otra mitad en el labo, porque además de compañera ya eres mi amiga, que me ayuda en todo y más y que sin su apoyo y cariño no hubiera llegado hasta aquí.

Gracias Raquelilla por toda tu gran ayuda sobretodo con los WB que eres una experta jejeje y por ser como eres, porque entramos prácticamente a la vez en el labo y siempre he tenido una conexión especial contigo.

Gracias a mis chicas que además de compañeras sois mi amigas, que grandes momentos de desayunos, comidas y charlas infinitas con muchas risas pero sobretudo por compartir muy buenos ratos tanto en el trabajo como fuera. A Lupita por su gran generosidad y su apoyo tanto con los experimentos de ratones como en todas nuestras charlas de ciencia y lo que no es ciencia..jejeje. A Sara por todas esas risas y por estar ahí cuando te he necesitado. A Ana por ser mi mejor ayudante, gracias por estar a mi lado y compartir todo juntas. A Belenchu por su infinita paciencia conmigo y también estar siempre ahí en todo momento.

Gracias al resto de compañeros de la Unidad por ayudarme con experimentos varios o por compartir muchas charlas en cultivos y en el citómetro , pinchos de Navidad o cenas varias (Vane, Pachi, Lara, Gema, Fati, Susi, Elena, M. elvira, Clara, Dani, Laura, L.Alvarez, Luiz, Susana, Luz..) Han sido casi 7 años estupendos y en gran parte gracias a vosotros.

Me gustaría también agradecerle su apoyo a mis amigas de toda la vida, gracias Eri y Bego por vuestras palabras de ánimo siempre y vuestro cariño y gracias Eri por hacerme por fin tía, Pablito ya te explicaré cositas de ciencia cuando seas más mayor.

Gracias a Ire, Moni, Sandri, Esther, Pili, Fran y Carol por ser los mejores compañeros de universidad y por ser parte de una de las mejores etapas de mi vida pero seguir ahí como el primer día.

Gracias a toda mi familia, familia política y amigos en especial a Mary, Manolo, Guadi, Isa, Javi, Marty, Chilo, Pane, Mery, Tere, mi tios Alfre, Titi, Tate, Mila, Pedro, Conchi, Rafa y mi primos Leti, Nacho, David, Loli y mis pequeñas Nadia y Yuna por comprenderme y quererme tal y como soy.

A Juanma gracias por estar a mi lado cada día. Por aguantarme y conseguir que salga adelante hasta en los momentos menos buenos. Por hacerme sentir especial a tu lado y por quererme tanto, te estoy eternamente agradecida por todo lo que haces por mi y por ayudarme en todo.

Gracias a mi hermanito Javi por estar siempre a mi lado y por ser un buen amigo.

Pero mi mayor agradecimiento se lo debo a mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, hayan sido buenas o malas, y especialmente por enseñarme a luchar por lo que quiero y a terminar lo que he empezado. Por su amor incondicional y por todas las enseñanzas y consejos que me han brindado. Han sido sin lugar a dudas, una pieza clave para que terminara la Tesis Doctoral.

Muchísimas gracias a TODOS

Resumen / Abstract

El tejido adiposo se compone de diversos elementos celulares incluyendo adipocitos, macrófagos y fibroblastos. En casos de obesidad aumenta el número y tamaño de los adipocitos y se produce la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo. Estos macrófagos producen muchas de las moléculas inflamatorias secretadas por el tejido adiposo como TNF- α que contribuye a la resistencia a la insulina y crea un estado de inflamación crónica de baja intensidad. Por lo tanto, un bloqueo de la producción de TNF- α mediante el tratamiento con un compuesto sintético podría ser una estrategia eficaz para el tratamiento de enfermedades metabólicas.

La proteína de unión a ácidos grasos FABP4/aP2 se expresa tanto en adipocitos como en macrófagos y coordina respuestas metabólicas e inflamatorias. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que FABP4 puede ser una buena diana terapéutica contra enfermedades como la diabetes tipo 2 y la aterosclerosis ya que un inhibidor sintético de FABP4 (BMS309403) mejora estas enfermedades en modelos animales y es capaz de inhibir la producción de TNF- α en la línea celular THP-1.

FABP4 se encuentra aumentada en pacientes con variables clínicas asociadas con el síndrome metabólico (ECV, aterosclerosis, diabetes) y en pacientes sometidos a hemodiálisis con enfermedad renal. Evaluamos las concentraciones séricas de FABP4, CCL18 y leptina en pacientes tratados con diálisis peritoneal (DP). Niveles altos de FABP4 en pacientes con mayores índices de riesgo cardiovascular sugieren que FABP4 podría ser un marcador de daño asociado a la DP. Además en nuestro estudio encontramos una correlación positiva entre FABP4 y CCL18 en los pacientes con mayor riesgo cardiovascular.

En nuestro trabajo estudiamos la capacidad de 36 compuestos sintéticos para modular la respuesta proinflamatoria de macrófagos humanos a través de la unión con FABP4 en condiciones en las que no se afecte la viabilidad celular con un bioensayo diseñado para tal efecto evaluada como producción de TNF- α y ensayos de unión a FABP4. Los 36 compuestos han sido derivados del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (PSA-3-49) que había sido previamente descrito como ligando selectivo de FABP4, así como derivados de sales de indolinio y bencimidazol.

Los resultados indican que el compuesto PSA-3-49 es en efecto un buen ligando, pero no inhibidor de la función proinflamatoria descrita para FABP4. Sin embargo, el tratamiento con PSA-3-49 disminuyó la liberación de FABP4 soluble en explantes de grasa humana y la fosforilación de AKT inducida por insulina en hepatocitos humanos. Por el contrario, encontramos que el compuesto EBM T78d no mostraba ninguna afinidad por la proteína FABP4 pero resultó ser un buen inhibidor de la producción de TNF- α y otras citoquinas tanto en la línea celular THP-1 como en células primarias (PBMcs y monocitos) estimuladas

previamente con LPS. Además, se exploró otra vía de estimulación a través de TLR3 y comprobamos que el tratamiento con el compuesto EBM T78d disminuyó la producción de TNF- α en varios tipos celulares.

Se ha evaluado también la expresión génica de varias citoquinas proinflamatorias en monocitos primarios y la actividad del factor de transcripción NF- κ B que disminuyen tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d, por lo que parece que podría estar regulando algunos factores de esta vía inflamatoria. Por último se han analizado *in vivo* los efectos del compuesto EBM T78d en ratón disminuyendo de igual modo la producción de citoquinas proinflamatorias.

En resumen, los resultados de este trabajo aportan evidencia experimental de que el compuesto EBM T78d es un buen agente anti-inflamatorio y su tratamiento con dosis farmacológicas podría ser de gran interés terapéutico en varias enfermedades proinflamatorias incluyendo aquellas relacionadas con el síndrome metabólico.

Por otra parte, el compuesto PSA-3-49 podría ser de interés terapéutico en enfermedades metabólicas debido a su potencial para regular tanto los niveles séricos de FABP4 como su efecto sobre el metabolismo hepático.

The adipose tissue is composed of or various cellular elements including adipocytes, macrophages and fibroblasts. In cases of obesity the number and size of adipocytes are increased as well as the accumulation of macrophages in the adipose tissue. These macrophages produce many of the inflammatory molecules secreted by the adipose tissue such as TNF- α , which contributes to insulin resistance and creates a state of chronic low-grade inflammation. Therefore, blocking the production of TNF- α by treatment with a synthetic compound could be an effective strategy for treating metabolic diseases.

FABP4 (Fatty acid binding protein 4)/aP2 is expressed in adipocytes and macrophages and coordinates metabolic and inflammatory responses. It has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* that FABP4 may be a good therapeutic target for diseases such as type 2 diabetes and atherosclerosis since a synthetic inhibitor FABP4 (BMS309403) improves these diseases in animal models and is able to inhibit TNF- α production in the human pro-monocytic cell line THP-1.

FABP4 is increased in patients with metabolic syndrome (cardiovascular disease, atherosclerosis, and diabetes) and in hemodialysis patients with renal disease. We evaluated FABP4, CCL18 and leptin levels in serum from peritoneal dialysis (PD) patients. High levels of FABP4 in patients with increased cardiovascular risk suggest that FABP4 could be a marker of damage associated with PD. Furthermore, our study suggests that there is a positive correlation between FABP4 and CCL18 in patients with increased cardiovascular risk.

In our work, we decided to study the ability of 36 synthetic compounds to modulate proinflammatory response in human macrophage evaluated as TNF- α production by binding to FABP4, in conditions in which cell viability was not affected with a bioassay designed for this purpose and protein binding assay. These synthetic compounds derived from 4-(9-carbazolyl) butanoic acid (PSA-3-49) which has been described as a selective ligand of FABP4. Benzimidazol-derived and indolinium salts were also evaluated.

The results suggest that the PSA-3-49 is a good ligand but not an inhibitor of the proinflammatory function described for FABP4. However, the treatment with PSA-3-49 decreased the release of soluble FABP4 in human fat explants and reduced FABP4 enhancement of insulin-induced AKT phosphorylation in hepatocytes.

By contrast, we found that the compound EBM T78d showed no affinity for FABP4 protein but proved to be a good inhibitor of TNF- α production and other cytokines in response to LPS in the human pro-monocytic cell line THP-1 as well as in primary cells (human peripheral blood lymphocytes/PBMCs and isolated human monocytes). In addition, other pathways of stimulation were explored through TLR3 and found that the treatment with EBM T78d decreased TNF- α production induced by poly I:C in several cell types.

We also assessed the gene expression of several proinflammatory cytokines in primary monocytes, as well as the activity of the transcription factor NF- κ B, which decreased after treatment with EBM T78d, suggesting that it could regulate some factors in this inflammatory pathway. Finally, we analyzed the *in vivo* effects of EBM T78d in a murine model of LPS-induced inflammation, likewise decreasing proinflammatory cytokine production.

In summary, the results of this study provide experimental evidence that the compound EBM T78d could be a good anti-inflammatory agent and treatment with pharmacologic doses could be of great therapeutic value in various proinflammatory diseases including those related to metabolic syndrome.

On the other hand, the compound PSA-3-49 could be of therapeutic interest in metabolic diseases given its putative capacity to regulate serum levels of FABP4 as well as its effect on the hepatic metabolism.

Índice

AGRADECIMIENTOS	13
RESUMEN / ABSTRACT.....	17
ÍNDICE.....	23
ABREVIATURAS	29
INTRODUCCIÓN	35
1. DISTRIBUCIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO	37
1.1 <i>Adipocitos</i>	39
1.1.1. Adipogénesis.....	40
1.2 <i>Macrófagos</i>	40
1.2.1. La citoquina proinflamatoria TNF- α	41
2. EL TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO	43
2.1 <i>Adipoquinas</i>	43
2.1.1 Leptina	43
2.1.2 Adiponectina.....	44
2.1.3 Citoquinas (TNF- α , IL-6 e IL-18) y Quimioquina MCP-1	45
3. ESTADO INFLAMATORIO ASOCIADO A LA OBESIDAD.....	46
3.1 <i>Obesidad y resistencia a la insulina</i>	51
3.2 <i>Interacción macrófagos-adipocitos</i>	53
4. PROTEÍNAS DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS (FABPs)	55
4.1 <i>FABPs en adipocitos y macrófagos</i>	57
4.1.1 FABPs en adipocitos: FABP4 y FABP5.....	57
4.1.2 FABPs en macrófagos: FABP4 y FABP5	58
4.2 <i>FABP4 en inmunidad e inflamación</i>	61
4.3 <i>Concentraciones plasmáticas de FABP4 circulante como un potente biomarcador</i>	63
4.4 <i>FABP4 como diana terapéutica</i>	65
4.4.1. Inhibidores químicos de FABP4	67
5. DIÁLISIS PERITONEAL Y RIESGO CARDIOVASCULAR.....	69
5.1 <i>Diálisis peritoneal (DP)</i>	69
5.2 <i>Riesgo cardiovascular en pacientes en DP</i>	70
OBJETIVOS	73
MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
1. COMPUESTOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO	79
1.1. <i>Compuestos derivados de ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico PSA-3-49</i>	79
1.2. <i>Otros compuestos similares a PSA-3-49 utilizados en los ensayos de unión a FABP4</i>	80
1.3. <i>Compuestos similares a PSA-3-49 con anillos benzídicos</i>	80
2. OBTENCIÓN DE PBMCs Y SUEROS DE DONANTES SANOS.....	82

3. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO DE CÉLULAS PRIMARIAS	82
4. AISLAMIENTO DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DIFERENCIACIÓN A CÉLULAS DENDRÍTICAS	82
5. CÉLULAS MESENQUIMALES Y ADIPOCITOS	83
5.1 Diferenciación adipogénica.....	84
6. BIOENSAYO PARA LA SELECCIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE TNF- α	85
7. ENSAYO DE UNIÓN DE FABP4 A LIGANDO: ENSAYO DE POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA.....	86
8. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> EN MODELO ANIMAL (RATÓN)	86
8.1 Modelo de inflamación inducido por LPS.....	86
8.2 Modelo de diálisis peritoneal (DP).....	87
8.3 Estudios histológicos.....	88
8.3.1 Tinción con hematoxilina-eosina	88
8.3.2 Tinción con tricrómico de Masson.....	88
9. CITOMETRÍA DE FLUJO	89
10. ELISA	89
11. CBA (CYTOMETRIC BEAD ARRAY)	90
12. EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR CUANTITATIVA.....	90
13. OBTENCIÓN DE PROTEÍNA DE FUSIÓN CON PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP)	91
14. SECUENCIACIÓN	92
15. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA EN COS-7	92
15.1 Transfección con DEAE-Dextrano.....	92
15.2 Transfección con Lipofectamina	93
16. NUCLEOFECCIÓN	93
17. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GFP <i>IN VITRO</i>	94
18. WESTERN-BLOT	94
19. SELECCIÓN DE PACIENTES	95
20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	96
RESULTADOS.....	97
1. BÚSQUEDA DE LIGANDOS DE FABP4: ANÁLISIS DEL EFECTO DE 36 COMPUESTOS SINTÉTICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TNF- α Y ENSAYOS DE UNIÓN A FABP4 RECOMBINANTE.....	99
1.1 Análisis del efecto del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (PSA-3-49) y de 13 compuestos sintéticos derivados del mismo (Familia PSA) sobre la producción de TNF- α estimulada con LPS....	99
1.1.1 Respuesta de la línea celular THP-1	99
1.1.2 Efecto de los compuestos sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	105
1.1.3 Respuesta en Monocitos aislados de individuos sanos	106
1.2 Análisis del efecto de 22 compuestos sintéticos (Familia EMB) derivados de sales de Bencimidazol (EMB-9) e indolinio(EMB-12) sobre la producción de TNF- α	108
1.2.1 Respuesta de la línea celular THP-1.....	108
1.3 Expresión de la proteína de fusión EGFP-FABP4	113

1.4 Ensayos de unión a FABP4	115
2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS PSA-3-49, PSA-3-64 Y PSA-3-65 (FAMILIA PSA)	117
2.1 Efectos de los compuestos de la familia PSA sobre la producción de otras citoquinas en distintos tipos celulares	118
A) Monocitos humanos aislados de sangre periférica estimulados con LPS (10ng/ml) durante 4h	118
B) Células madre mesenquimales de tejido adiposo estimulados con LPS (50ng/ml) durante 24 horas... ..	118
2.2. Modulación de la expresión génica de la citoquina IL-6 por el compuesto PSA-3-49	119
A) Preadipocitos.....	119
2.3 Regulación de rutas metabólicas por PSA-3-49	120
3. ANÁLISIS DEL COMPUESTO EBM T78D COMO POTENCIAL AGENTE ANTI-INFLAMATORIO	123
3.1. Efectos sobre de la producción de TNF- α en diversos tipos celulares	124
A) Modulación de la respuesta a LPS en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y monocitos aislados de donantes sanos además de macrófagos derivados de médula ósea de ratón.....	124
B) Modulación de la respuesta a poly I:C en monocitos aislados y en células dendríticas (DCs) diferenciadas in vitro	126
3.2 Efectos del compuesto EBM T78d sobre la producción de otras citoquinas en distintos tipos celulares.....	127
A) Efectos sobre la línea celular THP-1 estimulada con LPS.....	127
B) Efecto sobre monocitos humanos aislados de sangre periférica estimulados con LPS (10ng/ml) durante 4h.....	128
C) Efecto sobre la estimulación con Poly I:C en monocitos y células dendríticas inmaduras (iDCs).....	129
D) Modulación de la respuesta a IL-4 en monocitos.....	130
E) Efecto del compuesto EBM T78d sobre adipocitos humanos	131
3.3 Modulación de la expresión génica por el compuesto EBM T78d.....	133
A) Línea celular THP-1.....	133
B) Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y Monocitos primarios humanos.....	134
C) Pre-adipocitos y adipocitos maduros	135
3.4 Análisis de la modulación de la actividad NF- κ B por el compuesto EBM T78d	137
3.5 Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la fosforilación de las proteínas quinasas p38 y JNK.....	138
3.6 Análisis del efecto de la administración in vivo del compuesto EBM T78d.....	138
A) Modelo de diálisis peritoneal en ratón	139
B) Modelo de inflamación inducido por LPS intraperitoneal.....	139
4. FABP4 EN PACIENTES EN DIÁLISIS PERITONEAL: IMPLICACIONES EN RIESGO CARDIOVASCULAR Y SÍNDROME METABÓLICO	144
4.1 Medición de FABP4 en pacientes en diálisis peritoneal	145
4.2 Análisis de la relación de FABP4 con las distintas variables clínicas de los pacientes estudiados	147
A) FABP4 y Diabetes.....	147
B) FABP4 y enfermedad cardiovascular (ECV)	148

C) FABP4 y obesidad	149
D) FABP4 y Dislipidemia	149
<i>4.3 Análisis de la relación de FABP4 con las distintas citoquinas estudiadas</i>	<i>150</i>
A) Correlación entre FABP4 y CCL18	150
B) Correlación entre FABP4 y Leptina	152
DISCUSIÓN	155
1. BÚSQUEDA DE LIGANDOS DE FABP4	157
2. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL COMPUESTO PSA-3-49	161
3. ANÁLISIS DEL COMPUESTO EBM T78D COMO POTENCIAL AGENTE INFLAMATORIO	162
4. FABP4, DIÁLISIS PERITONEAL Y RIESGO CARDIOVASCULAR	166
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXOS	189

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AKT	Proteína quinasa B
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
C/EBPα	<i>CCAAT-enhancer-binding protein alpha</i>
COX2	Ciclooxygenasa 2
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Retículo endoplasmático
FABP4 (aP2)	Proteína de unión ácido graso tipo 4
FABP5	FABP epidermal
FABP	Fatty acid binding protein. Proteína de unión a ácidos grasos
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FFA	Ácidos grasos libres
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IKK	Proteína quinasa
IL-4	Interleuquina-4
IL-6	Interleuquina-6
IMC	Índice de masa corporal
IR	Resistencia a la insulina
JAK2	Quinasa Janus 2

JNK	cJun quinasa NH ₂ -terminal
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
LTA4	Leucotrieno A4
LXR	Receptor X del hígado
MCP1	Proteína quimioatrayente de macrófagos
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NF-κB	Factor nuclear de unión al gen de la cadena kappa de las inmunoglobulinas
n.s	no significativo
pAKT	Proteína quinasa B fosforilada
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
pJNK	cJun quinasa NH ₂ -terminal fosforilada
PKR	Proteína Quinasa R
PMA	Phorbol myristate acetate
PPAR-γ	Receptor alfa activado de proliferación de peroxisomas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
r.p.m	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Q-RT-PCR	Transcripción inversa y Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SOCS3	Supresor de la señalización de citoquinas 3
TLR	Receptor tipo Toll
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral α
TNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral α

TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TZD	Tiazolidineodionas
UCP2	Proteína desacoplante-2
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Inmunoblot

Introducción

Durante muchos años, el tejido adiposo se consideró como un órgano encargado de almacenar el exceso de energía en forma de grasas. Sin embargo, actualmente se ha establecido como un órgano endocrino altamente activo que modula el gasto de energía y la homeostasis de la glucosa (Kwon and Pessin, 2013).

Además es el encargado de la secreción de las adipoquinas, que incluyen citoquinas, enzimas, proteínas de la matriz, hormonas y factores de crecimiento y se ha demostrado que la desregulación de éstas adipoquinas está implicada en obesidad, diabetes tipo 2 (DM2) y la enfermedad cardiovascular (Smitka and Maresova, 2015).

Por lo tanto, el tejido adiposo es capaz de responder a diferentes estímulos metabólicos mediante una serie de mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos, encargándose de regular la homeostasis energética, la sensibilidad a la insulina, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, el crecimiento celular y la inflamación (Bays et al., 2008).

1. Distribución y organización del tejido adiposo

Existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón (o grasa parda) y el tejido adiposo blanco (Smorlesi et al., 2012).

El tejido adiposo marrón está implicado en la regulación de la energía a través de la termogénesis y la generación de calor en respuesta a los ambientes fríos por lo que es especialmente abundante en los recién nacidos ya que les permite mantener el calor corporal al pasar del vientre de la madre al exterior. Los adipocitos marrones presentan múltiples gotas lipídicas y numerosas mitocondrias circulares de gran tamaño que confieren una cierta tonalidad oscura, que es lo que da el nombre a este tejido. En el estado adulto el tejido adiposo marrón prácticamente desaparece.

Cuando se habla de tejido adiposo en general nos referimos al tejido adiposo blanco, cuya función más importante es el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos. Los adipocitos presentan una única gota lipídica que ocupa la mayor parte del citoplasma (Gesta et al., 2007).

Se diferencian dos depósitos principales de tejido adiposo: el depósito subcutáneo correspondiente al tejido adiposo que se localiza bajo la piel, y el depósito intraperitoneal, que se localiza dentro de la cavidad peritoneal donde se encuentra el tejido adiposo visceral. Hay a su vez dos tipos de tejido adiposo visceral: el mesentérico y el omental. El primero se encuentra envolviendo al intestino mientras que el segundo consiste en una especie de

delantal que se extiende desde la parte inferior del estómago recubriendo el abdomen y es el que normalmente se emplea en el estudio de la grasa visceral (Gesta et al., 2007) (Figura 1).

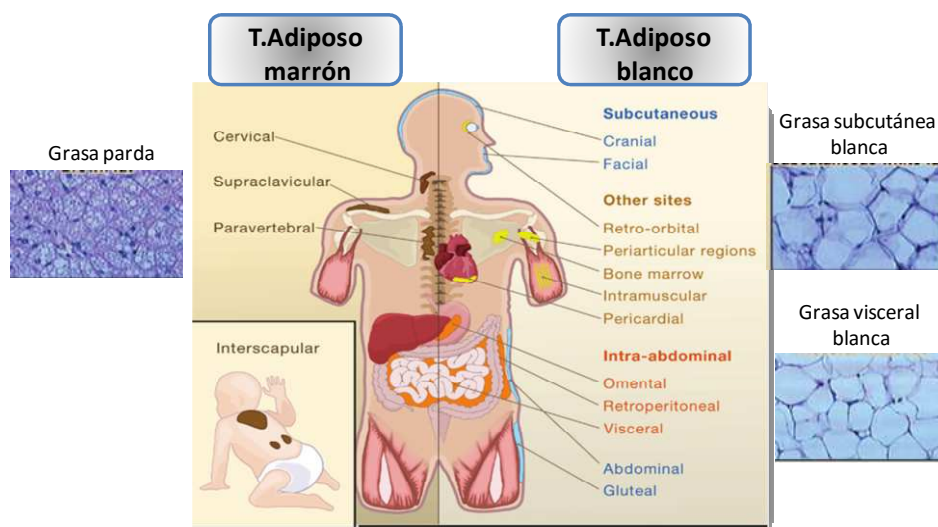


Figura 1: Distribución y localización del tejido adiposo: Tejido adiposo blanco y Tejido adiposo marrón. Modificado de Gesta et al., Cell 2007 (Gesta et al., 2007).

La obesidad se asocia principalmente con el aumento del tejido adiposo blanco que se encuentra comúnmente bajo la piel (subcutáneo) y alrededor de órganos viscerales (visceral). Este aumento además del tamaño de las células adiposas blancas conduce a la liberación de citoquinas y adipocinas inflamatorias que alteran la homeostasis energética y provoca una amplia gama de trastornos tales como las enfermedades cardiovasculares (Farmer, 2008). Las adipocinas que se liberan en obesidad interfieren con la señalización de insulina, causando resistencia a la insulina, que a su vez conduce a un aumento de la demanda de producción de insulina, y eventualmente conduce a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) si la producción de insulina no fuera suficiente para cubrir la demanda (Mosetti et al., 2016).

El tejido adiposo es un órgano extraordinariamente heterogéneo en cuanto a su composición y a su distribución corporal. Además de los adipocitos, el tejido adiposo está compuesto de una matriz de tejido conectivo, tejido nervioso, células del sistema inmune y vasos sanguíneos (Figura 2) (Ouchi et al., 2011), todos ellos fundamentales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo y que participan en la regulación del metabolismo glucídico y lipídico y en la producción y liberación de adipocinas (Malagon et al., 2013).

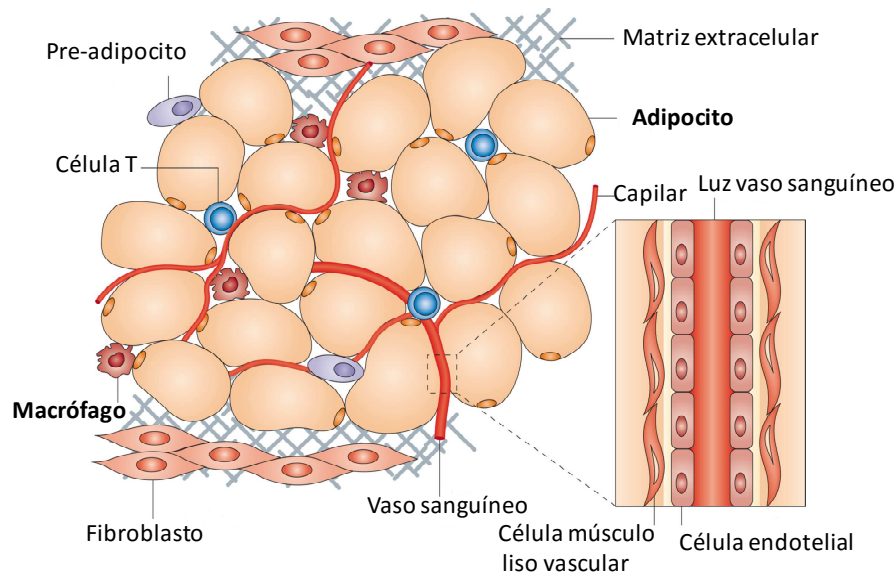


Figura 2: Los componentes del tejido adiposo.

Los adipocitos son el principal componente celular del tejido adiposo, y son cruciales para el almacenamiento de energía y la actividad endocrina. Los otros tipos de células que están presentes son los pre-adipocitos, fibroblastos, células vasculares y células inmunes, y todas ellas constituyen la fracción del estroma vascular del tejido adiposo. También las células vasculares en las que se incluyen tanto las células endoteliales y las células del músculo liso vascular se asocian con los vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos son necesarios para mantener un flujo adecuado de nutrientes y oxígeno a los adipocitos y permiten la distribución de adipoquinas. Otros componentes del tejido adiposo activo incluyen los macrófagos y las células T, que tienen un papel importante en la determinación del estado inmune del tejido adiposo. La matriz extracelular proporciona soporte mecánico y el exceso de matriz puede conducir a una disfunción del tejido adiposo. Los factores que son secretados por los diferentes componentes celulares son críticos para mantener la homeostasis en el tejido adiposo y en todo el cuerpo (Modificado de Ouchi et al., Nat Rev Immunol 2011).

1.1 Adipocitos

El principal componente celular del tejido adiposo son los adipocitos. Los adipocitos son células esféricas de entre 20-200µm de diámetro que contienen una o varias gotas lipídicas que equivalen prácticamente a todo su peso por lo que desplaza al resto de orgánulos a la periferia celular. Estos adipocitos son los encargados de realizar la lipogénesis, es decir, la síntesis de triglicéridos, los cuales una vez sintetizados son almacenados en la gota lipídica. También realizan la lipólisis, proceso mediante el cual los triglicéridos son convertidos en glicerol y ácidos grasos, que pasan al torrente sanguíneo donde son dirigidos hacia los tejidos que demandan un aporte de energía. Así el adipocito cambia de función según las necesidades fisiológicas y las demandas del organismo y ejerce una influencia sobre otras células mediante la secreción de adipoquinas (Burcelin, 2013).

Los adipocitos están inmersos en una matriz de colágeno (matriz extracelular) en la que también residen células madre mesenquimales, preadipocitos, terminales nerviosos, células sanguíneas y tejido vascular que, en conjunto, constituyen la denominada fracción de estroma

vascular (Figura 2). Aproximadamente el 10% de las células residentes en la fracción de estroma vascular son macrófagos CD14+CD31+ (Fantuzzi, 2005).

1.1.1. Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso durante el cual los fibroblastos como los pre-adipocitos se desarrollan a adipocitos maduros mediante diferentes estímulos. El proceso de adipogénesis consta de varias etapas secuenciales y ordenadas que incluyen de forma sucesiva: la determinación de linaje celular, expansión clonal y la diferenciación del adipocito (Figura 3). Además se requiere la activación secuencial de numerosos factores de transcripción, incluyendo PPAR γ y C/EBP α , responsables de la expresión de los genes adipogénicos que inducen la diferenciación de los fibroblastos a adipocitos. La inducción de PPAR γ y C/EBP α promueve la expresión de los principales genes que determinan el fenotipo adipocitario, como la sintasa de ácidos grasos (FAS), la glicerolfosfato deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa, el transportador de glucosa GLUT 4, el receptor de insulina y la chaperona de lípidos FABP4/aP2 (por sus siglas en inglés *fatty acid binding protein*), entre otros. PPAR γ es suficiente para inducir la expresión de la mayoría de los genes pro-adipocitarios, aunque C/EBP α es necesario para conferir al adipocito sensibilidad a la insulina (Spiegelman et al., 1993, Wu et al., 1999). Aunque muchos de los detalles moleculares de la adipogénesis son aún desconocidos, junto a los factores mencionados hay otros como la edad, el género y el estilo de vida que pueden afectar este proceso de una manera u otra (Ali et al., 2013).

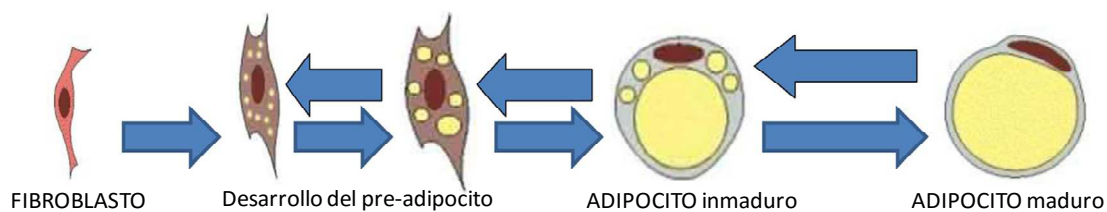


Figura 3: Diferenciación de los adipocitos. Las flechas muestran la capacidad inversa de los adipocitos maduros para disminuir de tamaño cuando disminuye el suministro de energía (por ejemplo en la pérdida de peso) (Modificado de Ali et al., Eur J Cell Biol 2013).

1.2 Macrófagos

Además de los adipocitos, como se ha comentado anteriormente, el tejido adiposo contiene fibroblastos, pre-adipocitos, macrófagos que residen en este tejido y constituyentes vasculares.

Los macrófagos son un tipo de células mieloides que derivan de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea (HSCs) y que son fundamentales en la inmunidad innata debido a su producción de citoquinas en respuesta a los PAMPs (del inglés *pathogen-associated molecular pattern molecules*) y DAMPs (del inglés *damage-associated molecular pattern molecules*)(Lee, 2013).

La acumulación de macrófagos en el tejido adiposo es proporcional a la adiposidad tanto en humanos como en ratón (Weisberg et al., 2003, Xu et al., 2003) y una pérdida de peso sostenida se asocia con una reducción en el número de macrófagos del tejido adiposo que se acompaña de una disminución del perfil proinflamatorio en individuos obesos (Cancello et al., 2005).

Los macrófagos representan un 40% de todas las células del tejido adiposo en ratones obesos en comparación con el 10% en ratones delgados. La población de macrófagos se incrementa en el tejido adiposo durante la obesidad debido a las mayores cantidades de varios factores, incluyendo los ácidos grasos libres (FFA) o el colesterol (Olefsky and Glass, 2010). Por lo tanto, los macrófagos son contribuyentes cruciales en el proceso inflamatorio sistémico general ya que están implicados también en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación inducida por la obesidad en el tejido adiposo.

La acumulación de macrófagos en el tejido adiposo se asocia con el incremento de marcadores inflamatorios (TNF- α , IL-6) que están relacionados con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Cottam et al., 2004).

1.2.1. La citoquina proinflamatoria TNF- α

El TNF- α (factor de necrosis tumoral) es una típica citoquina proinflamatoria multifuncional que se expresa principalmente en monocitos y macrófagos tras la estimulación por señales de peligro o productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS)(Kawai and Akira, 2007). Es una proteína transmembrana de 26 kDa (Kwon and Pessin, 2013) también producida por una gran variedad de células como linfocitos, queratinocitos, fibroblastos etc (Chung and Benveniste, 1990).

Se expresa en dos formas: una proteína precursora transmembrana y otra soluble (sTNF- α) (Horiuchi et al., 2010). La forma soluble es escindida a partir de la proteína transmembrana por la enzima convertidora de TNF- α (TACE, por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*) (Gooz, 2010). El precursor (pro TNF- α) de 233 aa y con un peso molecular de 26 kDa se ancla a la membrana mediante secuencias hidrofóbicas y por medio de la enzima TACE/ADAM17 se va a producir la liberación de la forma soluble madura de 17KDa y 157aa.

Una vez liberada al medio, la forma soluble madura tiende a formar complejos de diferente número de unidades, aunque la forma activa es el trímero.

TNF- α señala a través de dos receptores triméricos (TNFR1 y TNFR2) expresados en diversas células del sistema inmunológico y del resto del organismo. Ambos receptores tienen diferencias en su expresión génica pero debido a su expresión constitutiva se considera que el TNFR1 es el principal receptor regulador de las funciones de TNF- α (Chen and Goeddel, 2002).

Tras la unión de TNF- α a TNFR1, el complejo TRADD-RIP1-TRAF2 es liberado de TNFR1, e inmediatamente después comienza la fosforilación de los inhibidores del factor nuclear κ B (NF- κ B) mediante diversas quinasas, que lleva a la liberación y translocación del factor de transcripción NF- κ B desde el citoplasma al núcleo. Este factor de transcripción se une a secuencias específicas del ADN en el núcleo celular e induce la expresión de genes relacionados con inflamación, autoinmunidad y maduración de la respuesta inmune innata y adaptativa (Horiuchi et al., 2010). Aunque TNFR1 dispara la respuesta inmune inflamatoria mediada por TNF- α , se ha observado que TNFR2 está involucrado en la regulación de la proliferación de las células del sistema inmunitario, citotoxicidad y activación de NF- κ B (Chen and Goeddel, 2002).

Teniendo en cuenta su participación como un regulador maestro de otras citoquinas inflamatorias, se ha postulado que el TNF- α es la citoquina más importante en la patogénesis de trastornos inflamatorios inmunes (Kuek et al., 2007), incluyendo las enfermedades autoinmunes, la resistencia a la insulina y el cáncer.

La expresión de TNF- α se incrementa en obesidad y se correlaciona positivamente con la resistencia a la insulina en humanos (Hotamisligil et al., 1993). El tratamiento con TNF- α induce resistencia a la insulina en el tejido adiposo (Ruan and Lodish, 2003), mientras que la supresión de TNF- α o de sus receptores mejora la sensibilidad a la insulina en los animales obesos (Uysal et al., 1997).

El TNF- α , por sus múltiples funciones biológicas, tiene un papel determinante en la inflamación, inicio, progresión y riesgo a padecer diversas enfermedades cardiovasculares (McKellar et al., 2009). Además, un bloqueo bioquímico, farmacológico o genético de las acciones del TNF- α , da lugar a una sensibilidad a la insulina muy incrementada (Uysal et al., 1997). Por lo tanto, la inhibición de la sobre-expresión de TNF- α puede ser una estrategia eficaz para la prevención y el tratamiento de enfermedades metabólicas e inmunes.

A pesar del éxito logrado con medicamentos biológicos, el mecanismo de administración por inyección y los altos costes asociados han limitado su uso. Por otra parte, éstos medicamentos son inmunogénicos y algunos pacientes que reciben el tratamiento a largo plazo desarrollan anticuerpos, lo que a su vez conduce a una pérdida de la respuesta (Hsu et al., 2014).

2. El tejido adiposo como órgano endocrino

Como se mencionaba en apartados anteriores, además de encargarse del almacenamiento de energía en forma de lípidos, el tejido adiposo es considerado un órgano endocrino y secreta varias hormonas tales como la leptina y adiponectina (Iwabu et al., 2010), factores de crecimiento como el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Hagberg et al., 2012), mediadores pro- y anti-inflamatorios (integrina $\alpha 4$, interleuquinas IL-6, IL-1 β y el factor de necrosis tumoral TNF- α) (Xu et al., 2003) y proteínas del complemento (Wang et al., 2014). Estos factores que se liberan por el tejido adiposo se denominan colectivamente adipoquinas (Berg and Scherer, 2005) e intervienen en funciones tan relevantes como la regulación de la homeostasis energética y vascular, sensibilidad a la insulina, angiogénesis, regulación del metabolismo lipídico y en la respuesta inmune (de Oliveira et al., 2015). Se precisa un control de la secreción de estos factores ya que alteraciones en la concentración de adipoquinas causan modificaciones en la homeostasis corporal como ocurre en condiciones de obesidad, DM2 y síndrome metabólico (Lanthier and Leclercq, 2014).

2.1 Adipoquinas

Las adipoquinas son proteínas producidas principalmente por los adipocitos. Aunque el tejido adiposo secreta una gran variedad de factores, sólo la leptina y adiponectina (y, posiblemente, la resistina, la adipsina, y visfatina) se producen principalmente por los adipocitos y pueden por lo tanto ser debidamente clasificadas como adipoquinas (Fantuzzi, 2005).

Aunque las adipoquinas tienen múltiples funciones metabólicas, nos centraremos principalmente en las inflamatorias que juegan un papel importante en la resistencia a la insulina inducida por obesidad. En este sentido, dividimos las adipoquinas en pro- y anti-inflamatorias según sus efectos sobre la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo (Leal Vde and Mafra, 2013).

2.1.1 Leptina

La leptina es una proteína multifuncional de 16 kDa secretada principalmente por los adipocitos y es fundamental en la regulación del balance energético.

El control del apetito es la función principal de leptina. De hecho, los ratones con una mutación en el gen de leptina (ratones ob / ob) o en el receptor de la leptina (ratones db/db), así como individuos humanos con mutaciones en los mismos genes sufren de obesidad mórbida (Friedman, 2002).

La leptina se secreta en el tejido adiposo por lo que tiene efectos directos sobre el mismo o indirectos sobre otros órganos periféricos tales como hígado, músculo, hueso, hipófisis o páncreas. La leptina también juega un papel importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa, independiente de las acciones en la ingesta de alimentos, gasto de energía o el peso corporal. La leptina mejora la sensibilidad a la insulina en el hígado y músculo esquelético y regula la función de las células β del páncreas (Marroqui et al., 2012).

Además, la leptina tiene efectos proinflamatorios promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-12) e inhibe las citoquinas anti-inflamatorias Th2 como IL-4 en células T CD4+ (Lord et al., 1998).

Los niveles circulantes de leptina y su expresión en el tejido adiposo se incrementan en respuesta a citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1) (Gan et al., 2012) y la endotoxina LPS (Grunfeld et al., 1996).

En resumen, las interacciones entre la leptina y la inflamación son bidireccionales: citoquinas proinflamatorias aumentan la síntesis y liberación de leptina, que a su vez contribuye a mantener un estado inflamatorio crónico característico de la obesidad (Paz-Filho et al., 2012)(Figura 4).

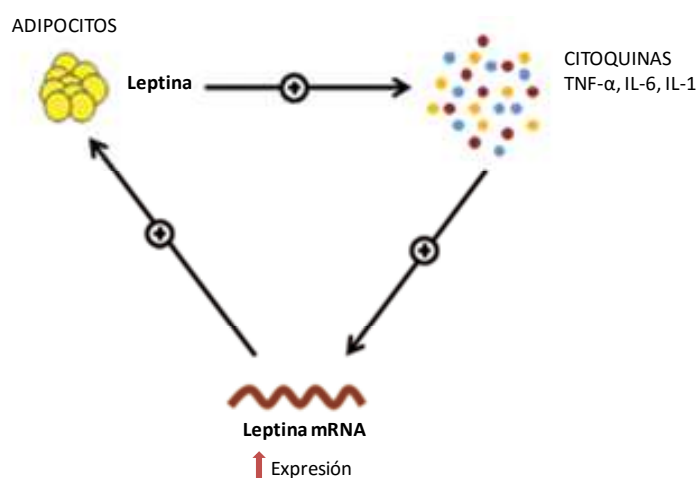


Figura 4: Interacción entre la leptina y citoquinas. La leptina regula la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 (IL-1), y la interleuquina (IL-6). Estas citoquinas aumentan la expresión del ARNm de la leptina, y posteriormente la producción de leptina. Se ha postulado que este sería el mecanismo de inflamación crónica en individuos obesos (Modificado de Paz-Filho et al., Arq Bras Endocrinol Metabol 2012).

2.1.2 Adiponectina

Es una adipoquina altamente expresada por los adipocitos con propiedades anti-inflamatorias y, de hecho, constituye una de las hormonas circulantes más abundantes. La adiponectina es una proteína de 30 kDa metabólicamente activa que se asocia inversamente con la obesidad, resistencia a la insulina, y la aterosclerosis (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Se han descrito dos

receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, que son particularmente abundantes en músculo y en hígado aunque también se expresan en otros tejidos (Yoo and Choi, 2014).

Por otra parte, está claramente establecido que existe una relación inversa entre los niveles de adiponectina en plasma y el índice de masa corporal así como la resistencia a insulina y el estado inflamatorio (Esfahani et al., 2015).

2.1.3 Citoquinas (TNF- α , IL-6 e IL-18) y Quimioquina MCP-1

El tejido adiposo secreta numerosas moléculas incluyendo varias citoquinas. Las citoquinas son polipéptidos producidas por células del sistema inmune y por el tejido adiposo, en donde juegan un papel importante en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos y participan en la regulación del balance energético del organismo (Grant and Stephens, 2015).

Entre las citoquinas proinflamatorias más importantes producidas por el tejido adiposo se encuentran TNF- α e IL-6.

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina proinflamatoria que además de ser producida por macrófagos, linfocitos activados y células endoteliales, es también producida por los adipocitos (Zhang et al., 2014) y puede estar involucrada en la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad. Clínicamente, los niveles plasmáticos de IL-6 se correlacionan positivamente con la adiposidad en humanos (Fried et al., 1998) de tal manera que los niveles de IL-6 aumentan en sujetos obesos y se observó una reducción de los niveles de IL-6 con la pérdida de peso (Ziccardi et al., 2002). Además, los niveles plasmáticos de IL-6 incrementan en pacientes con diabetes tipo 2 y el aumento de estos niveles son predictivos para el desarrollo de la diabetes tipo 2. Se estima que aproximadamente un tercio del total de IL-6 circulante es producida por el tejido adiposo, y es posible que el aumento de la secreción de IL-6 en condiciones de obesidad contribuya a la disfunción metabólica. Sin embargo, el papel de la IL-6 en obesidad y en la resistencia a la insulina ha sido motivo de controversia (Kwon and Pessin, 2013). La administración periférica de IL-6 interrumpe la señalización de la insulina debido al aumento de la expresión de SOCS3 en hepatocitos sugiriendo que la expresión de IL-6 inducida por obesidad media en la resistencia a la insulina (Senn et al., 2003).

Por el contrario, ratones deficientes en IL-6 muestran una obesidad y una inflamación hepática y la administración de IL-6 invierte la resistencia a la insulina (Matthews et al., 2010).

Por lo tanto, las diferentes acciones de IL-6 en la señalización de la insulina pueden ser debidas a sus acciones dispares en diferentes órganos (hígado frente al músculo) o las diferentes fuentes de IL-6 (músculo frente a grasa) (Mooney, 2007, Pedersen and Febbraio, 2007).

Anteriormente ya detallamos las características de la otra citoquina proinflamatoria más importante producida además de por los monocitos/macrófagos por el tejido adiposo como es TNF- α . En el tejido adiposo, TNF- α induce lipólisis en adipocitos aumentando los ácidos grasos libres (Zhang et al., 2002) que a su vez se unen a TLR4, promoviendo la expresión de factores proinflamatorios a través de la activación de NF- κ B (Lee et al., 2001). En consonancia con este modelo, ratones deficientes en TLR4 muestran una mejora en la resistencia a la insulina (Kim et al., 2007). El tejido adiposo produce además otras citoquinas tales como IL-1 e IL-18 que se incrementan en el suero de sujetos obesos (Fantuzzi, 2005, Esposito et al., 2002). Las quimioquinas son una familia de citoquinas que inducen la quimiotaxis de leucocitos y están profundamente implicados en el desarrollo de enfermedades alérgicas y enfermedades autoinmunes. Estudios previos han demostrado que los preadipocitos y adipocitos secretan quimioquinas, como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) también conocida como CCL2 que contribuye al reclutamiento de monocitos en el tejido adiposo por lo que se correlaciona con la adiposidad corporal (Christiansen et al., 2005). Otras citoquinas que produce el tejido adiposo son resistina, *retinol-binding protein 4* (RbP4), lipocalina 2, *angiopoietin-like protein 2* (ANGPTL2) y *CXC-chemokineligand 5* (CXCL5) (Ouchi et al., 2011).

3. Estado inflamatorio asociado a la obesidad

El exceso de alimentación y el estilo de vida sedentario inducen a una acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo dando como resultado a la obesidad. La obesidad se ha convertido en un problema de salud (más del 60% de los adultos estadounidenses tienen sobrepeso o son obesos) y está estrechamente asociada con enfermedades metabólicas como la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2 (DM2), hipertensión, enfermedad de hígado graso no alcohólico y enfermedades de ovario poliquístico (Finkelstein et al., 2012).

La inflamación es una serie de respuestas celulares y moleculares que sirven para defender al organismo de infecciones o agresiones. Los principales actores celulares en el proceso inflamatorio son las células del sistema inmune.

La obesidad se caracteriza por ser un estado crónico de inflamación de bajo grado con una progresiva infiltración de células del sistema inmune en el tejido adiposo. Se considera bajo grado de inflamación porque produce niveles mucho más bajos de citoquinas circulantes que en otro tipo de inflamación y se considera una enfermedad crónica ya que requiere tratamientos de dieta relativamente largos (> 8 semanas en modelos animales) antes de que sea claramente discernible en el tejido adiposo.

Por lo tanto, la inflamación inducida por la obesidad puede ser un tipo diferente de inflamación ya que es el resultado de sobrealimentación y de estrés en las vías que conducen a la homeostasis metabólica anormal (por ejemplo, altos niveles de lípidos, FFA, glucosa o ROS) (Lee and Lee, 2014).

Cuando se alcanza la capacidad de expansión máxima de un depósito de tejido adiposo (es decir, cuando los adipocitos se han expandido al máximo y se vuelven hipertróficos por acumulación de lípidos) se produce la disfunción del tejido adiposo y la infiltración de células inmunes que se asocia con la resistencia a la insulina del propio tejido (Figura 5) (Liang et al., 2013, Lafontan, 2014). Además, los adipocitos y las células inmunes infiltradas de este tejido adiposo inflamado producen mediadores inflamatorios que se liberan a la circulación.

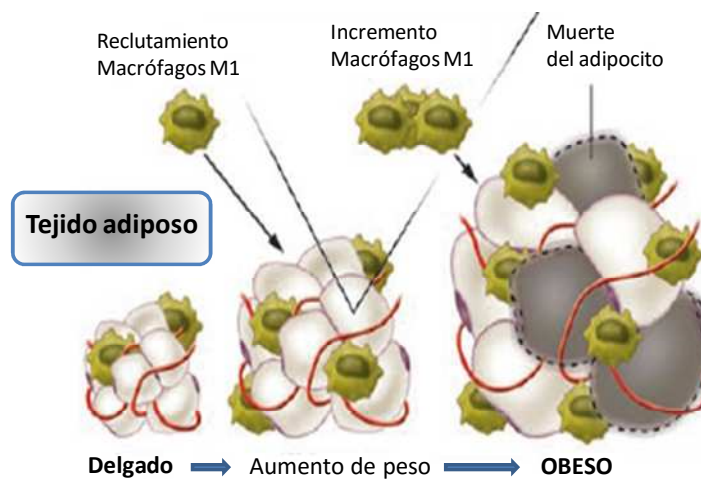


Figura 5: Proceso inflamatorio en el tejido adiposo
Modificado de Schenk et al., J Clin Invest 2008 (Schenk et al., 2008).

La incidencia de trastornos metabólicos incluyendo la resistencia a la insulina (IR), DM2, enfermedades cardiovasculares y enfermedad de hígado graso no alcohólico se cree que derivan de la inflamación crónica (Hotamisligil and Erbay, 2008, Shoelson et al., 2006). Por lo tanto la obesidad es el mayor factor de riesgo para la DM2 y para la aterosclerosis, enfermedades que se asocian con la resistencia a la insulina, la hipertensión arterial y otras enfermedades cardiovasculares (Hotamisligil, 2006, Rosen and Spiegelman, 2006). Por lo tanto, el tejido adiposo se convierte en una fuente de inflamación que puede conducir a la patogénesis en otros tejidos (Figura 6).

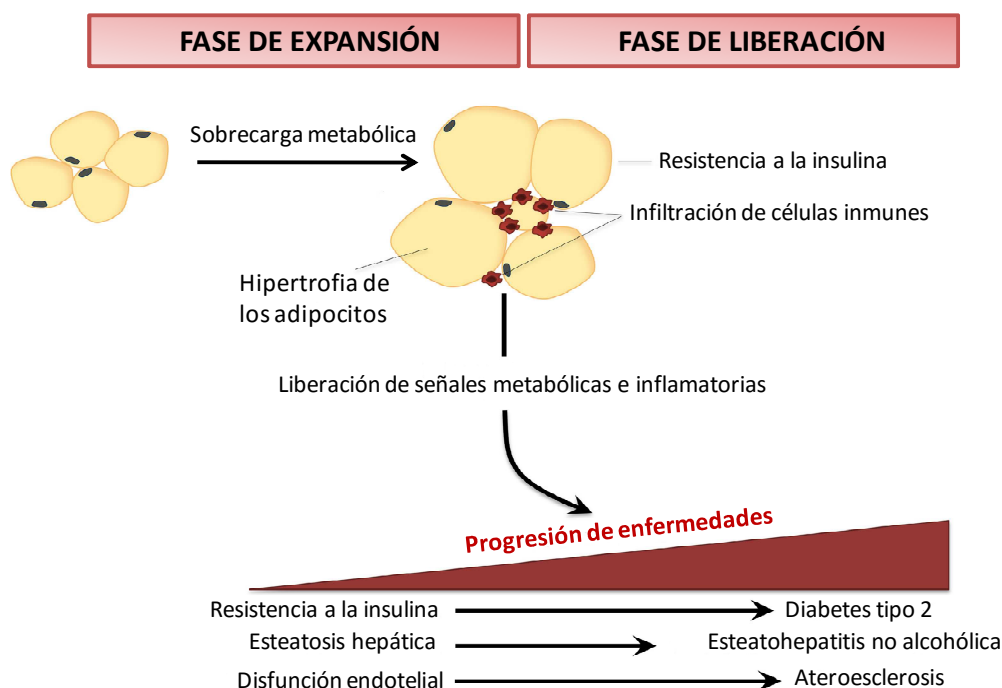


Figura 6: En la obesidad, el tejido adiposo puede convertirse en una fuente de inflamación que impulsa el desarrollo de la enfermedad en órganos distantes. El exceso calórico y el exceso de nutrientes, es decir, sobrecarga metabólica, conduce a la expansión de los depósitos del tejido adiposo (fase de expansión). Cuando se alcanza la capacidad de expansión máxima de un depósito adiposo debido a la sobrecarga metabólica prolongada, el tejido adiposo se vuelve disfuncional, está infiltrado por células del sistema inmune, y se convierte en resistente a la insulina. Los adipocitos y las células inmunes infiltradas producen mediadores inflamatorios que se liberan a la circulación (fase de liberación) y conducen a la progresión de enfermedades relacionadas con la obesidad en órganos distantes, como la diabetes tipo 2, enfermedad del hígado graso no alcohólico, y la aterosclerosis. Modificado de Morrison et al, Front Immunol 2015 (Morrison and Kleemann, 2015).

El tejido adiposo es sin lugar a dudas el sitio patológico donde se inicia localmente la resistencia a la insulina inducida por la obesidad, antes de volverse sistémica. La producción endocrina y paracrina de proteínas bioactivas refleja un estado inflamatorio generalizado en este tejido. El adipocito por sí mismo es clave en el inicio del desarrollo de inflamación inducida por obesidad (Krotkiewski et al., 1983).

La obesidad asociada a la inflamación sistémica también se caracteriza por el aumento de las concentraciones circulantes de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, así como la activación de varias quinasas que regulan la inflamación, como JNK, IKK β , mTOR y el factor nuclear (NF- κ B) que interfieren en la acción de la insulina en los adipocitos y hepatocitos (Shoelson et al., 2006).

Los resultados en estudios con animales y en experimentos *in vitro* han sugerido que los macrófagos del tejido adiposo (ATMs, por sus siglas en inglés) juegan un papel crítico en el

establecimiento de la inflamación crónica y de las disfunciones metabólicas como DM2 e IR (Koppaka et al., 2013). Además, los avances en la investigación de la obesidad han conducido al reconocimiento de que la inflamación inducida por la obesidad es principalmente mediada por las células inmunes, tales como macrófagos y linfocitos T, en los tejidos metabólicos.

Los ATMs son una fuente importante de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6, que pueden bloquear la acción de la insulina en el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético a través de la señalización autocrina y/o paracrina. Posteriormente, esto puede causar resistencia a la insulina sistémica a través señales endocrinas, lo que representa un posible vínculo entre la inflamación y la resistencia a la insulina (Neels and Olefsky, 2006, Hotamisligil et al., 1993).

La remodelación del tejido adiposo asociado a la obesidad fue descrita por primera vez por Cinti y colaboradores en 2005 (Cinti et al., 2005) como la existencia de un número significativo de las llamadas "estructuras de tipo corona" (CLS, por sus siglas en inglés), que consiste en macrófagos rodeando los adipocitos muertos en modelos animales y seres humanos. La alta cantidad de CLS está correlacionada con la inflamación del tejido adiposo y los trastornos metabólicos y son considerados como lesiones patológicas en el tejido adiposo de individuos obesos (Aouadi et al., 2013). Durante la remodelación del tejido adiposo, la muerte de los adipocitos puede ser suficiente para iniciar la infiltración de macrófagos e inducir inflamación en el tejido adiposo. Se ha planteado la hipótesis de que las pequeñas moléculas liberadas por los adipocitos muertos puedan activar los receptores de tipo Toll (TLR) en los macrófagos y adipocitos vecinos, lo que induce una liberación de factores proinflamatorios (Lee et al., 2010).

Los individuos obesos se pueden dividir en dos categorías: los que tienen el control metabólico totalmente disfuncional y aquellos que tienen el control metabólico ligeramente disfuncional (Figura 7). Las personas obesas con disfunción metabólica leve tienen menores niveles de expresión de los marcadores inflamatorios y menor riesgo cardiovascular en comparación con los individuos obesos metabólicamente disfuncionales (Apovian et al., 2008). Además los individuos obesos metabólicamente disfuncionales presentan un mayor número del CLS reflejando un estado proinflamatorio que se debe en parte a un deterioro del proceso de fagocitosis mediada por macrófagos (Ouchi et al., 2011).

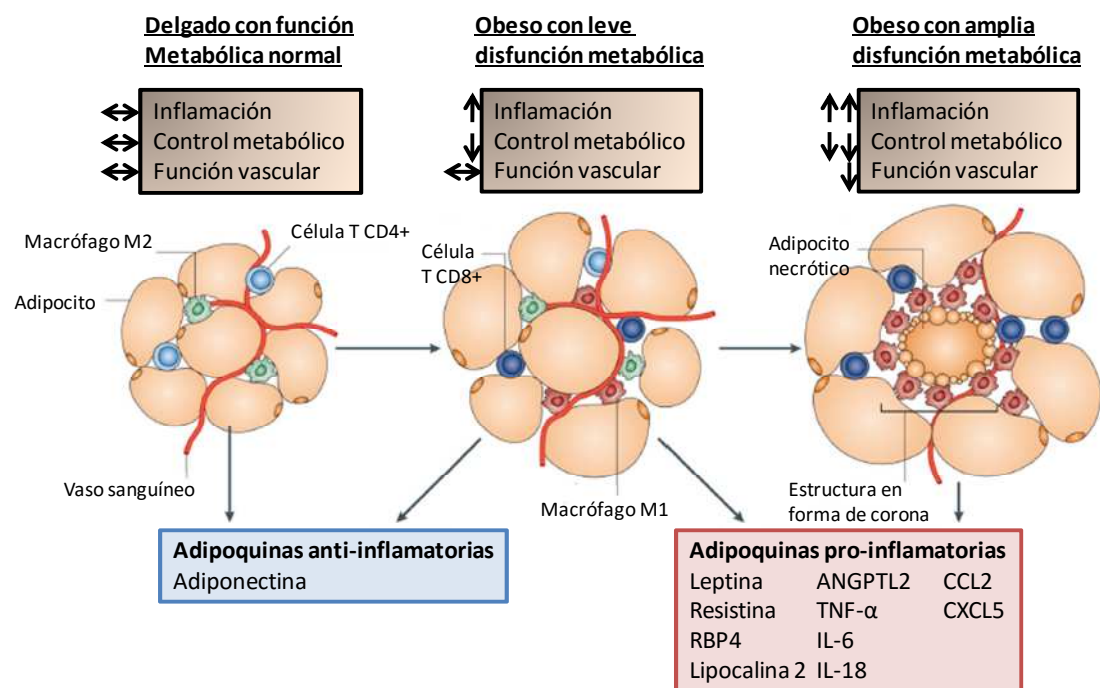


Figura 7: Modulación fenotípica del tejido adiposo.

El tejido adiposo se puede dividir en al menos tres clasificaciones estructurales y funcionales:

Delgado con función metabólica normal, obeso con disfunción metabólica leve y obesos con disfunción metabólica completa. Conforme se desarrolla la obesidad, los adipocitos se hipertrofian debido a la mayor capacidad de almacenamiento de triglicéridos. Con una obesidad leve, es probable que el tejido conserve la función metabólica relativamente normal y tenga bajos niveles de activación de las células inmunes con una suficiente función vascular. Sin embargo, los cambios cualitativos en el tejido adiposo en expansión pueden promover la transición hacia un fenotipo metabólicamente disfuncional. Los macrófagos en individuos delgados expresan marcadores tipo M2 o alternativamente activados mientras que la obesidad conduce a la acumulación de macrófagos M1 o clásicamente activados así como células T en el tejido adiposo. Adipoquinas anti-inflamatorias se producen en el tejido adiposo de individuos delgados mientras que en obesidad, el tejido adiposo genera grandes cantidades de factores pro-inflamatorios. El tejido adiposo metabólicamente disfuncional puede estar asociado con niveles más altos de la necrosis de adipocitos y los macrófagos M1 se disponen alrededor de éstas células muertas en estructura tipo corona. ANGPTL2: *angiopoietin-like protein 2*; RBP4: *retinol-binding protein 4*. Modificado de Ouchi et al, Nat Rev Immunol 2011 (Ouchi et al., 2011).

Los macrófagos y sus precursores los monocitos son poblaciones de células altamente heterogéneas. Tras la polarización de citoquinas, los macrófagos se dividen en macrófagos activados clásicamente (M1) o macrófagos proinflamatorios y los macrófagos activados alternativamente (M2) o macrófagos anti-inflamatorios, que presentan diferentes activadores, marcadores y función (Bai and Sun, 2015).

Los macrófagos M2 predominan en el tejido adiposo de individuos delgados y ayudan a mantener la sensibilidad a la insulina a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias tales como IL-4 e IL-10, mientras que los macrófagos M1 conducen a la resistencia a la insulina a través de la secreción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-6 e IL-1 β que a su vez conducen a un ambiente proinflamatorio en el tejido adiposo y hepático, al menos en un

modelo murino de obesidad inducida mediante dieta rica en grasas (Lumeng et al., 2007). Estos estudios sugieren que la polarización de macrófagos M1 y M2 está estrechamente asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina.

En resumen, un abordaje mediante estrategias terapéuticas que contrarresten el desequilibrio de adipocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias podría ser un medio útil y eficaz para prevenir y/o tratar las enfermedades metabólicas y cardiovasculares relacionadas con la obesidad.

3.1 Obesidad y resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (IR) es la incapacidad de las células (en el músculo, hígado y la grasa) para responder adecuadamente a la insulina endógena, lo que resulta en un aumento de los niveles de glucosa en la sangre.

Como hemos dicho antes, la inflamación crónica inducida por la obesidad juega un papel importante en el desarrollo de IR y DM2 inducida por la obesidad. Los mediadores inflamatorios en el tejido adiposo pueden causar IR en los adipocitos, por ejemplo los adipocitos tratados con TNF- α muestran una disminución de la señalización de la insulina y posteriormente en la absorción de la glucosa (Hotamisligil et al., 1994, Stephens et al., 1997).

Los nutrientes u otros metabolitos pueden activar citoquinas o receptores tipo Toll (TLRs) mediante la interacción con dianas celulares o por medio de moléculas chaperonas. Las quinasas JNK, IKK, y PKR se sitúan por debajo de los receptores TLR en la cascada de señalización y tienen un papel importante en la transmisión de las señales de estrés en toda la célula y las respuestas metabólicas acopladas.

Estas tres quinasas pueden inhibir la señalización de insulina a través de la fosforilación en serinas del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) que conduce a la ubiquitinación y degradación de IRS-1, bloqueando así la acción de la insulina a través del receptor en la cascada de señalización. Además estas tres quinasas pueden inducir una respuesta inflamatoria a través de la activación de los factores de transcripción AP-1, NF- κ B e IRF, que aumentan la expresión génica de mediadores inflamatorios. El incremento de las citoquinas inflamatorias puede conducir a la activación de receptores nucleares así como las señales combinadas de citoquinas con el exceso de nutrientes establecen un bucle de retroalimentación positiva de la inflamación (Figura 8) (Gregor and Hotamisligil, 2011).

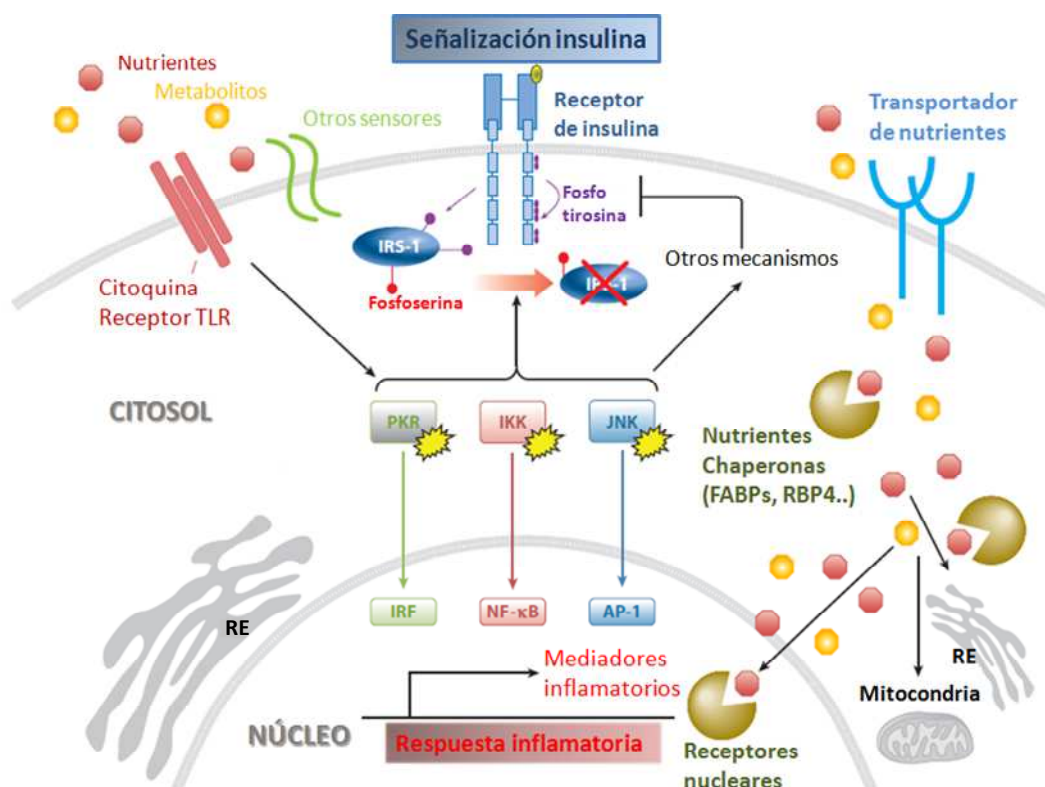


Figura 8: Cascada de señalización en la alteración inflamatoria de las funciones metabólicas. Obesos o dieta rica en grasas conducen a la inducción de la señalización inflamatoria en las células metabólicas a través de varios caminos. Modificado de Gregor et al, Ann Rev of Immunol 2011 (Gregor and Hotamisligil, 2011).

El vínculo funcional entre la señalización inflamatoria y la resistencia a la insulina ha sido demostrado *in vivo*. En modelos de ratón, se ha demostrado que la pérdida de los genes codificantes de TNF- α , TNFR1/2, JNK o TLR2 tiene efectos metabólicos beneficiosos cuando los animales son obesos (Uysal et al., 1997, Hirosumi et al., 2002). Por ejemplo, los ratones deficientes en TNF- α (TNF- $\alpha^{-/-}$) sometidos a una dieta rica en grasas para inducirles obesidad disminuyeron los niveles de glucosa y de insulina en sangre en comparación con los ratones control, junto con la mejora del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. En consonancia con estos datos, la administración de TNF- α recombinante en cultivos celulares o en modelos animales da lugar a una resistencia a las acciones de la insulina, mientras que un bloqueo bioquímico, farmacológico o genético a las acciones del TNF- α , da lugar a una sensibilidad a la insulina muy incrementada (Saghizadeh et al., 1996, Maachi et al., 2004).

Los efectos de la inflamación en el tejido adiposo no se limitan solamente a la señalización de insulina. El tratamiento de adipocitos *in vitro* con citoquinas inflamatorias tales como TNF- α puede inducir lipólisis, una característica del tejido adiposo en obesidad (Feingold et al., 1992). Además, la señalización inflamatoria en el adipocito puede disminuir la actividad del receptor

nuclear PPAR γ que es esencial para la adipogénesis y para el mantenimiento de la expresión y la función de genes en el adipocito. En efecto, sin PPAR γ la capacidad de los adipocitos para sintetizar, almacenar lípidos y mantener la sensibilidad a la insulina se ve comprometida ya que una importante consecuencia de la disminución en la expresión de PPAR γ inducida por la inflamación es la reducción de la expresión de la adiponectina que también está implicada en la regulación de la sensibilidad a la insulina sistémica (Trujillo and Scherer, 2005).

Por lo tanto, se observa que los efectos de la inflamación sobre el tejido adiposo son multifacéticos pero tienen una meta en común: la ruptura de los procesos normales en el adipocito en favor de respuestas de estrés. Sin el adecuado funcionamiento y acción endocrina del tejido adiposo, el depósito de nutrientes en el cuerpo se interrumpe y se desequilibra la homeostasis de la glucosa.

3.2 Interacción macrófagos-adipocitos

Como ya se ha mencionado, las interacciones entre respuesta inflamatoria y metabolismo son importantes en la patogénesis de un grupo de enfermedades metabólicas (diabetes tipo 2, enfermedad de hígado graso, resistencia a la insulina) y tienen lugar preferentemente en el tejido adiposo.

En términos de la respuesta inmune, la interacción de los macrófagos y los adipocitos tiene un perfecto sentido, dado que ambos tipos celulares participan en la respuesta inmune innata: los macrófagos en su papel de células inmunes cuyas acciones se dirigen a destruir patógenos y secretar citoquinas inflamatorias y quimioquinas; y los adipocitos en sus funciones de liberar lípidos que pueden modular el estado inflamatorio o participar en la neutralización de dichos patógenos. Hormonas que son altamente específicas, producidas por el tejido adiposo tales como la adiponectina, resistina, visfatina y leptina, actúan también en la interfase de los sistemas metabólico e inmune (Fantuzzi, 2005).

En individuos obesos, la interacción entre los adipocitos y macrófagos agrava la inflamación crónica en el tejido adiposo (Wellen and Hotamisligil, 2003). Adipoquinas proinflamatorias como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y TNF- α y los ácidos grasos liberados por los adipocitos interactúan con el complejo TLR4 que induce a la activación de NF- κ B en los macrófagos residentes (Suganami et al., 2005). Por su parte, los macrófagos activados también liberan quimioquinas proinflamatorias como MCP-1, reclutando monocitos de la circulación al sitio de inflamación del tejido adiposo (Kamei et al., 2006). Una vez que se infiltran los monocitos en el tejido adiposo maduran e interactúan con los adipocitos de una manera paracrina a través de la producción de TNF- α , incrementando la producción de adipoquinas

proinflamatorias y reduciendo la producción de adiponectina. Además, la expresión génica de los macrófagos y los adipocitos es similar: los macrófagos expresan la mayoría de los productos proteicos del adipocito, como las proteínas transportadoras de ácidos grasos FABP4/aP2 y el PPAR γ , mientras que los adipocitos pueden expresar muchas proteínas proinflamatorias que podrían considerarse exclusivas de macrófagos, tales como TNF- α , IL-6 y MMPs (por sus siglas en inglés *matrix metalloproteinases*). La habilidad funcional de estos dos tipos de células también coincide y se sobrepone (Figura 9). Los macrófagos pueden atraer, englobar y almacenar lípidos para convertirse en células espumosas ateroscleróticas (*foam cells*) (Wellen and Hotamisligil, 2005).

Estas interacciones entre los adipocitos y los macrófagos establecen y mantienen el estado de inflamación crónica en obesos a través del reclutamiento de nuevos monocitos/macrófagos de la circulación de forma continua (Bai and Sun, 2015).

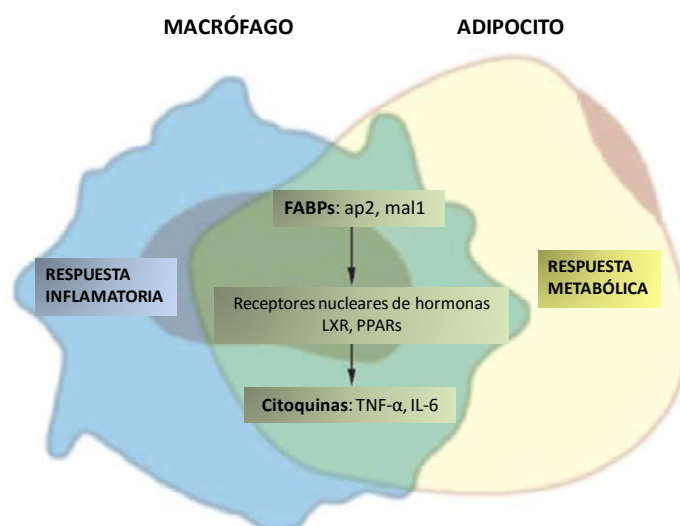


Figura 9: Características comunes de adipocitos y macrófagos.

En la obesidad, el tejido adiposo se inflama, tanto a través de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y como resultado los adipocitos en sí mismos se convierten en productores de citoquinas inflamatorias. La inflamación del tejido adiposo es un paso crucial en el desarrollo de la resistencia periférica a la insulina. Además, en condiciones pro-ateroscleróticas como la obesidad y la dislipidemia, los lípidos se acumulan en los macrófagos para convertirse en células espumosas. Los adipocitos y macrófagos comparten características comunes, tales como la expresión de citoquinas, FABPs, receptores nucleares de hormonas y muchos otros factores. Como lo demuestran modelos genéticos de pérdida de función, las FABPs de los adipocitos/macrófagos modulan tanto la acumulación de lípidos en los adipocitos como la acumulación de colesterol en los macrófagos, así como el desarrollo de resistencia a la insulina y la aterosclerosis. Las vías de PPAR γ y LXR (receptor X del hígado) se oponen a la inflamación y promueven la liberación de colesterol de los macrófagos y el almacenamiento de lípidos en los adipocitos. Modificado de Wellen et al, J Clin Invest 2005 (Wellen and Hotamisligil, 2005).

4. Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs)

Como hemos dicho anteriormente, la inflamación crónica de bajo grado se ha observado en varios tipos de trastornos metabólicos como en la obesidad, IR, DM2 y en la enfermedad cardiovascular (Gregor and Hotamisligil, 2011). Esta inflamación atípica que emerge de los tejidos metabólicos se conoce como metainflamación y es provocada por el exceso de nutrientes y metabolitos que estimulan un grupo de moléculas implicadas en las vías de señalización de la inflamación. Tales rutas de señalización están mediadas por JNK, IKK, PKR y otras proteína-quinasas que son las responsables de la inhibición de la señalización de la insulina y de la producción adicional de mediadores inflamatorios a través de la regulación transcripcional mediante la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B (Hirosumi et al., 2002).

Los lípidos componen un conjunto grande y heterogéneo de compuestos que cumplen funciones esenciales (energética, estructural) en todo organismo vivo y como moléculas de señalización intracelular y extracelular. Por ejemplo, los lípidos pueden modificar la acción o localización de quinasas y pueden servir como ligandos para factores de transcripción (Wahli and Michalik, 2012).

La característica común de los ácidos grasos es la de ser poco solubles en agua y su potencial toxicidad como formas libres (Gordon, 1977). Debido a esto, por lo general se los encuentra unidos a proteínas. La unión reversible del lípido a la proteína aumenta su solubilidad favoreciendo así su transporte.

Existe una gran variedad de proteínas que unen lípidos (LBPs, por sus siglas en inglés) que difieren en su localización, estructura y capacidad de unir ligandos lipídicos.

Las FABPs (proteínas de unión a ácidos grasos) son un grupo de LBPs. En mamíferos constituyen una familia de proteínas citoplasmáticas conocidas como chaperonas de lípidos intracelulares de alrededor de 15 kD que regulan el tráfico de lípidos en las células (Furuhashi and Hotamisligil, 2008, Furuhashi et al., 2011b). Las FABPs pueden unirse reversiblemente a ligandos hidrofóbicos como ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados, eicosanoides y otros lípidos con alta afinidad y selectividad (Zimmerman and Veerkamp, 2002). Las FABPs se encuentran en todas las especies, desde *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* hasta roedores y humanos, lo que demuestra una fuerte conservación evolutiva (Chmurzynska, 2006).

En 1972 se publicó el primer trabajo sobre FABPs (Ockner et al., 1972) y hasta la fecha se han identificado 9 diferentes isoformas en mamíferos que difieren en su distribución tisular y afinidad por sus ligandos (Tabla 1).

Tipo FABP	Nombre del gen	Otros nombres	Tejidos
FABP del hígado	FABP1	L- FABP	Hígado, intestino, estómago.
FABP intestinal	FABP2	I- FABP	Intestino, estómago.
FABP del corazón	FABP3	H-FABP	Corazón, aorta, músculo esquelético, glándula mamaria, placenta, cerebro, testículos, ovario, riñón.
FABP del adipocito	FABP4	A-FABP; aP2	Tejido adiposo, macrófagos.
FABP epidérmica	FABP5	E-FABP; mal1	Cerebro, piel, retina, endotelio, tejido adiposo, hígado, riñón, macrófagos.
FABP ileal	FABP6	II-FABP	Ovario, íleon.
FABP del cerebro	FABP7	B-FABP	Cerebro.
FABP de la mielina	FABP8	M-FABP	Sistema nervioso periférico.
FABP del testículo	FABP9	T-FABP	Testículos.

Tabla 1: Tipos de FABPs y su localización tisular

Las diferentes isoformas de FABPs comparten entre un 15-70% de identidad de secuencia. Sin embargo, las estructuras tridimensionales están bien caracterizadas y son muy similares (Chmurzynska, 2006). Existen diferencias entre las distintas isoformas en cuanto a la afinidad y selectividad de la unión al ligando debido a las diferencias estructurales. En general, moléculas hidrofóbicas tienen una alta afinidad de unión para las FABPs a excepción de los ácidos grasos insaturados.

Las FABPs pueden regular distintas funciones. Entre ellas las más importantes son:

- 1.- La generación, distribución, y acoplamiento de los lípidos como mensajeros de señalización a sus dianas biológicas a través de la interacción directa con diversas enzimas.
- 2.- El reparto de ligandos al núcleo.
- 3.- El secuestro o captura de mediadores lípidicos como los ácidos grasos, eicosanoides, y oxisteroles.

Se les atribuye una participación en cáncer, diabetes tipo 2, enfermedad de hígado graso y arterioesclerosis. Por lo tanto, compuestos que modifiquen las funciones de las FABPs pueden

ofrecer oportunidades terapéuticas para estas enfermedades anteriormente citadas (Makowski and Hotamisligil, 2005).

4.1 FABPs en adipocitos y macrófagos

Entre las FABPs, FABP4 conocida como FABP del adipocito (A-FABP), es una de las isoformas mejor caracterizada (Tabla 1). FABP4 o A-FABP se detectó por primera vez en el tejido adiposo y los adipocitos maduros. Se denomina también aP2 ya que comparte una alta similitud de secuencia (67%) con la proteína P2 de la mielina (M-FABP/FABP8) (Hunt et al., 1986). FABP4 está altamente expresada en adipocitos y constituye aproximadamente el 1% de todas las proteínas solubles en el tejido adiposo. FABP5, conocido como FABP epidérmica o mal1, se expresa abundantemente en la mayoría de las células epidérmicas de la piel pero también está presente en otros tejidos y células incluyendo los adipocitos (Furuhashi and Hotamisligil, 2008). La cantidad de FABP5 es aproximadamente 100 veces menor que la de FABP4 en adipocitos. FABP4 y FABP5 tienen un 52 % de homología a nivel de secuencia de aminoácidos y se unen a una variedad de ácidos grasos con parecida afinidad y selectividad. Curiosamente, tanto FABP4 como FABP5 se expresan en macrófagos y células dendríticas (Makowski et al., 2001, Rolph et al., 2006).

El contenido de FABP4 en los adipocitos es 10.000 veces más alto que en los macrófagos y en animales deficientes en FABP4, la expresión de FABP5 aumenta para compensar la deficiencia en el tejido adiposo; pero no en los macrófagos o células dendríticas. Los modelos animales demuestran que tanto FABP4 como FABP5 juegan un papel muy importante en la regulación de la sensibilidad a la insulina y el desarrollo de aterosclerosis y que sus acciones implican a adipocitos y macrófagos (Hotamisligil et al., 1996, Uysal et al., 2000, Furuhashi et al., 2008).

4.1.1 FABPs en adipocitos: FABP4 y FABP5

FABP4 está altamente expresada en adipocitos. Su expresión se induce durante la diferenciación de los adipocitos y está controlada transcripcionalmente por agonistas de PPAR γ , insulina, ácidos grasos y dexametasona (Kletzien et al., 1992).

La evidencia clara de cómo las FABPs afectan específicamente la biología celular y el metabolismo lipídico generó mucha controversia hasta la creación de modelos animales deficientes en FABPs para estudiar los efectos de la capacidad de alteración en la unión de los ácidos grasos en vivo.

Cuando se eliminan FABPs en ratón, todos muestran alteraciones en el metabolismo de los lípidos, pero solamente los modelos deficientes de FABP4 (aP2^{-/-}) y FABP5 (mal1^{-/-}) han sido caracterizados extensamente por desarrollar síndrome metabólico (Furuhashi and Hotamisligil, 2008). El primer modelo roedor deficiente de FABP creado fue el aP2^{-/-}, cuyo fenotipo no mostró ninguna anomalía. Los ratones fueron saludables, sin defectos en su tejido adiposo, reproducción o crecimiento.

Para provocar sobrecarga en las rutas lipídicas de estos ratones aP2^{-/-} o deficientes, se indujo obesidad con una dieta rica en grasas, apareciendo de forma drástica el fenotipo de obesidad. Y a pesar de haber alcanzado un peso ligeramente superior que sus controles aP2^{+/+} (normales o tipo silvestre), los ratones aP2^{-/-} estaban protegidos de desarrollar resistencia a la insulina, aunque tuvieron niveles de ácidos grasos libres ligeramente superiores a los de los controles. En cuanto a sus niveles de colesterol y los triglicéridos estuvieron en un nivel inferior al de los controles.

La mejora de la sensibilidad a la insulina y las alteraciones en el metabolismo de los lípidos en el modelo de ratón deficiente en aP2 es un antecedente que estimula la generación de nuevos estudios que examinen el potencial impacto de este modelo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, que es el componente clave del síndrome metabólico (Uysal et al., 2000).

Se ha descrito que FABP4 activa la lipasa sensible a hormonas (HSL) en los adipocitos, regulando la lipólisis. Así, los adipocitos deficientes en FABP4 reducen la eficiencia de la lipólisis (Scheja et al., 1999).

La pérdida de FABP4 en los adipocitos de ratones aP2^{-/-} se compensa con la sobreexpresión de FABP5/mal1. En los ratones transgénicos en los que FABP5 se sobreexpresa en el tejido adiposo, la lipólisis basal y la lipólisis estimulada por hormonas se mejoraron mientras que la sensibilidad a la insulina se redujo en los ratones con dieta rica en grasas. La deficiencia de FABP5 aumenta ligeramente la sensibilidad a la insulina sistémica en un modelo animal de ratón con dieta rica en grasas u obesidad genética. Los adipocitos deficientes en FABP5 demostraron una mayor capacidad de transporte de glucosa estimulada por la insulina (Maeda et al., 2003).

4.1.2 FABPs en macrófagos: FABP4 y FABP5

Se generó un modelo de deficiencia de FABP4/aP2 en el modelo murino de aterosclerosis conocido como (apo) E^{-/-} (ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE)). En estos estudios los ratones aP2^{-/-} (apo) E^{-/-} desarrollaron un 88% menos aterosclerosis en la aorta,

comparados con animales $aP2^{+/+}$ (apo) $E^{-/-}$, bajo dieta normal de laboratorio, y 91% menos aterosclerosis cuando fueron sometidos a una dieta rica en grasa. Esta sorprendente protección ocurre independientemente de las alteraciones en las concentraciones de los lípidos séricos y la sensibilidad a la insulina sistémica.

Este gran impacto de la deficiencia de FABP4 sobre la aterosclerosis, hizo que se investigara si FABP4 puede actuar localmente en la formación de lesiones, y se encontró que esta proteína también se expresa en macrófagos, que son las células clave para la iniciación y promoción de la aterosclerosis. Hasta este momento se pensaba que FABP4/aP2 se expresaba exclusivamente en adipocitos, pero se comprobó que los macrófagos también expresan FABP4/aP2.

Como hemos dicho anteriormente, tanto FABP4 como FABP5 se expresan también en los macrófagos y las células dendríticas aunque la cantidad de FABP4 en los adipocitos es aproximadamente 10.000 veces mayor que en los macrófagos. Además a diferencia de lo que ocurre en adipocitos, en macrófagos la ausencia de FABP4 no se ve compensada por una sobreexpresión de FABP5.

La expresión de FABP4 se induce durante la diferenciación de monocitos a macrófagos por el tratamiento con LPS, PMA, agonistas de PPAR γ , lipoproteínas de baja densidad oxidadas y productos finales de la glicación avanzada (Fu et al., 2002, Kazemi et al., 2005).

Se ha demostrado que la atorvastatina, un fármaco reductor del colesterol, reduce la expresión de FABP4 en macrófagos, mientras que la metformina, un fármaco antidiabético, inhibe la transcripción de FABP4 mediada por FoxO1 y reduce la acumulación lipídica en los macrófagos (Song et al., 2010).

Furuhashi y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de FABP4/aP2 conduce a la acumulación de colesterol en los macrófagos y que la inhibición de esta proteína puede ser clave para el tratamiento de la aterosclerosis y la diabetes en un modelo animal (Furuhashi et al., 2007). Estos datos sugieren que los efectos locales de FABP4 en los macrófagos son críticos en la formación de las lesiones ateroscleróticas, más que los efectos potenciales sistémicos mediados a través de FABP4/aP2 expresada en adipocitos, al menos en el contexto de los modelos estudiados (Makowski et al., 2001).

Otros trabajos demostraron que FABP4 juega un importante papel en el macrófago en la generación de la respuesta inflamatoria y el tráfico de colesterol (Makowski et al., 2005) y han dado lugar a la proposición de un modelo según el cual en presencia de FABP4, habría poca

disponibilidad de ácidos grasos libres (FFA) y éstos FFA serían incapaces de interactuar con PPAR γ u otros componentes de la ruta IKK-NF- κ B, por lo que FABP4 podría actuar para controlar la señalización por esta ruta. En ausencia de FABP4, aumentaría la disponibilidad de FFA que inhiben la ruta NF- κ B, causando el bloqueo de respuestas inflamatorias y aumentan la actividad de PPAR γ causando un aumento del tráfico de colesterol (Figura 10).

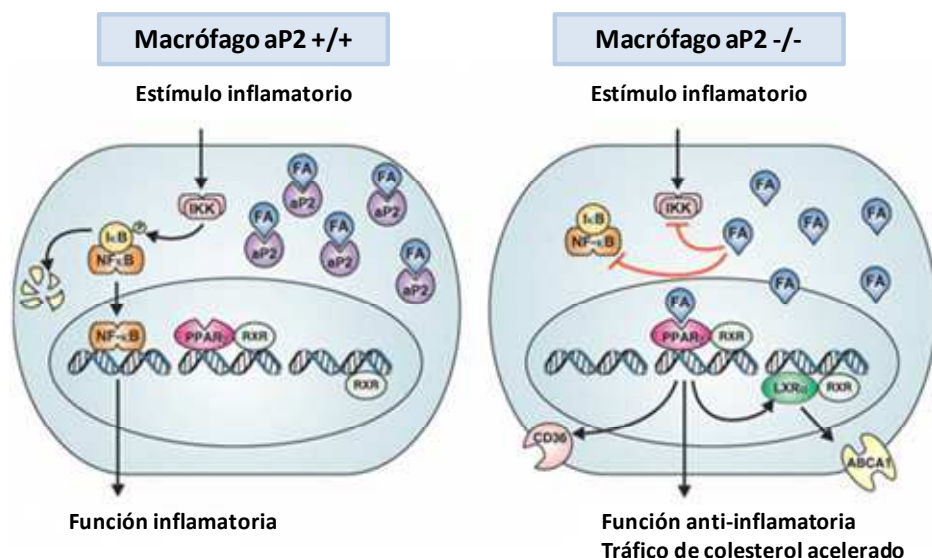


Figura 10: Regulación de la función del macrófago por aP2 (FABP4)
Modificado de Makowski et al, J Biol Chem 2005 (Makowski et al., 2005).

El potencial inflamatorio reducido en animales deficientes en FABP4 (aP2^{-/-}) puede estar relacionado con el aumento de la actividad o expresión de PPAR y LXR, ya que estos receptores nucleares inhiben la transcripción de genes que codifican algunas proteínas inflamatorias. El modelo sugiere que FABP4/aP2 podría controlar las rutas de señalización del macrófago que contribuyen a la producción de citoquinas proinflamatorias.

La expresión de FABP5 en los macrófagos aumenta por el tratamiento de agonistas de receptores tipo Toll (TLR) como el agonista de TLR4, LPS, y el agonista de TLR2, zymosan. FABP5 también puede desempeñar un papel en la aterosclerosis a través de TLRs u otros mecanismos. La deficiencia de FABP5 suprime la aterosclerosis que se asocia con una reducción de la expresión de genes inflamatorios como IL-6 y la ciclooxygenasa-2 (COX2) y la supresión del reclutamiento de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas a causa de disminución de la expresión del receptor de quimioquinas CCR2 (Babaev et al., 2011).

Como se describió anteriormente, tanto FABP4 como FABP5 en los adipocitos y los macrófagos juegan un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina y la aterosclerosis

(Hansson and Hermansson, 2011). Los ratones con deficiencia combinada FABP4 y FABP5 ($FABP4^{-/-} FABP5^{-/-}$) en los modelos de obesidad dietética o genética mejoran la resistencia a la insulina y protegen contra la diabetes tipo 2 y la enfermedad de hígado graso (Maeda et al., 2005).

Además, el modelo de ratón deficiente en FABP4 y FABP5 cruzado con el modelo de aterosclerosis deficiente en ApoE suprimió drásticamente el desarrollo de la aterosclerosis en comparación con los ratones deficientes solamente en FABP4 o controles. Curiosamente este modelo de ratón ($FABP4^{-/-}, FABP5^{-/-}, ApoE^{-/-}$) siguiendo una dieta rica en grasas tiene una tasa de supervivencia más alta que los ratones $ApoE^{-/-}$, probablemente debido a una mejor estabilidad de la placa aterosclerótica y una mejor salud metabólica (Boord et al., 2004).

Las acciones de las dos FABPs tienen distintas funciones en adipocitos y macrófagos en la regulación de la sensibilidad a la insulina a través de las respuestas metabólicas e inflamatorias como se muestra en la Figura 11. Aunque se demostró que el impacto de FABP4/FABP5 sobre la aterosclerosis era debido principalmente a las acciones en los macrófagos, en la modulación de la sensibilidad a la insulina la acción predominante se relaciona con las FABPs de los adipocitos con una modesta contribución de los macrófagos (Furuhashi et al., 2011b).



Figura 11: Interacción de los adipocitos y macrófagos. FABP4 y FABP5, en los adipocitos y macrófagos, son fundamentales para la regulación de las respuestas inflamatorias y metabólicas en cada tipo celular y también la interacción de los dos tipos de células. Modificado de Furuhashi et al, Int J Inflamm 2011 (Furuhashi et al., 2011b).

4.2 FABP4 en inmunidad e inflamación

La expresión FABP4 en los macrófagos está regulada en gran medida por PPAR γ . PPAR γ es el principal regulador de la diferenciación de los adipocitos; pero se expresa también en

monocitos en respuesta a LDL oxidada y se acumula en niveles altos en las lesiones ateroscleróticas (Tontonoz et al., 1998).

La relación entre PPARs y la actividad FABP es compleja y puede ser dependiente del contexto. Aunque PPAR γ puede iniciar la expresión de FABP4, los efectos metabólicos de la acción de FABP4 (específicamente la activación de la lipólisis y la supresión de la lipogénesis) parecen estar en oposición a los de PPAR γ . De hecho, la actividad de PPAR γ se incrementa en los macrófagos deficientes en FABP4, lo que da lugar a un flujo de colesterol acelerado y una disminución del contenido de colesterol (Makowski et al., 2005). Igualmente, la actividad de PPAR γ está elevada en macrófagos deficientes en FABP5.

Además, FABP4 puede aumentar la degradación proteosomal de PPAR γ y por consiguiente el efecto de FABP4 parece suprimir la actividad de PPAR γ (Figura 12).

Los macrófagos deficientes en FABP4 reducen la expresión basal y estimulada de citoquinas proinflamatorias como MCP-1 y TNF- α así como la disminución de la actividad IKK- β /NF- κ B. También se ha demostrado que FABP4/aP2 regula la ruta IKK-NF- κ B en las células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés), regulando la producción de citoquinas tales como IL-12 y TNF- α en DCs y afectando por tanto a la estimulación de linfocitos T y al desarrollo de la respuesta inmune posterior (Rolph et al., 2006).

Estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos de ratón han conseguido identificar una serie de funciones intracelulares de FABP4 como:

- FABP4 suprime la lipogénesis del tejido adiposo y promueve la lipólisis, con efectos directos sobre la composición del conjunto de ácidos grasos libres circulantes y locales.
- FABP4 también está implicada en la modulación del equilibrio de los eicosanoides al afectar tanto la actividad de COX2 como la estabilidad de LTA4.
- FABP4 podría mediar la actividad de PPAR γ mediante el control de la disponibilidad de ligando, y los modelos genéticos sugieren que FABP4 se opone a la acción de PPAR γ .
- FABP4 también puede interactuar con HSL (lipasa sensible a hormonas), JAK2 y CD36.

Todos estos procesos influyen en la función de los macrófagos y la inflamación del tejido adiposo, y en consecuencia, FABP4 actúa sobre múltiples vías integradas para regular el metabolismo de lípidos y la inflamación, deteriorar la acción de la insulina, la promoción de la producción de glucosa, y contribuir a la patogénesis de enfermedades metabólicas inmunes tales como diabetes mellitus y la aterosclerosis (Hotamisligil and Bernlohr, 2015) (Figura 12).

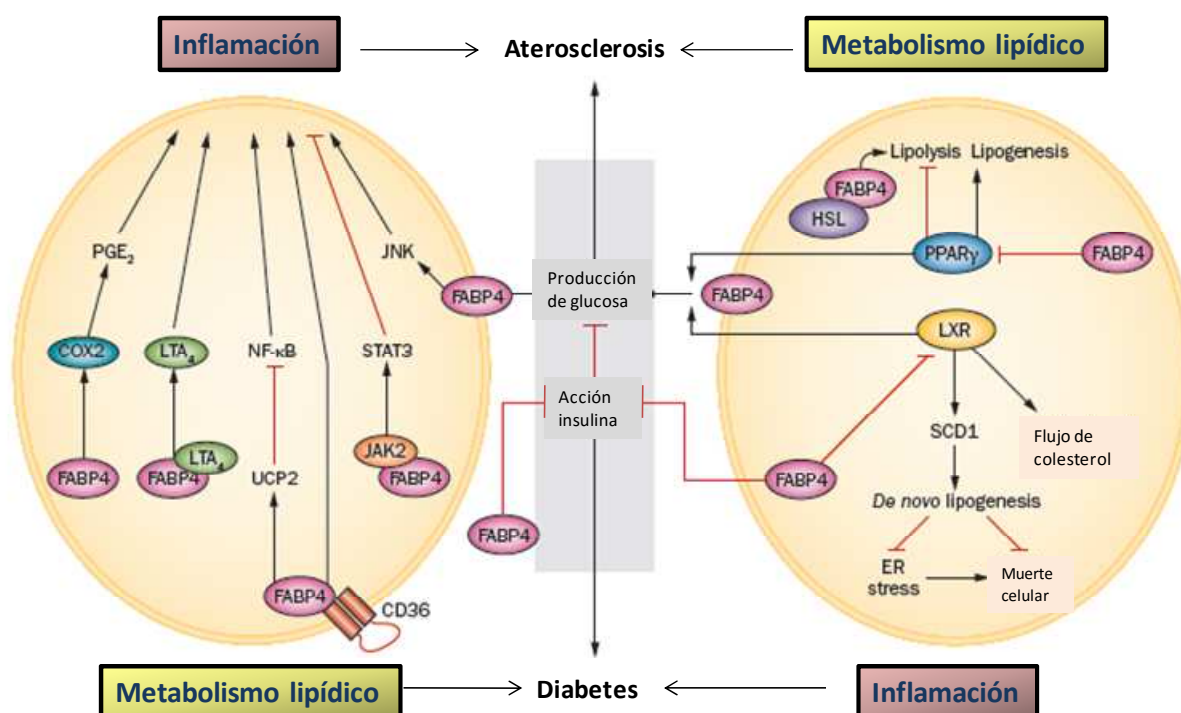


Figura 12: Resumen de las funciones intracelulares de FABP4.

Modificado de Hotamisligil et al, Nat Rev Endocrinol 2015(Hotamisligil and Bernlohr, 2015).

4.3 Concentraciones plasmáticas de FABP4 circulante como un potente biomarcador

Aunque FABP4 es fundamentalmente una proteína intracelular, se ha detectado FABP4 soluble en medios de cultivo de adipocitos (Cao et al., 2013) y en fluidos biológicos, principalmente suero y plasma (Ishimura et al., 2013) (Tso et al., 2007).

Los niveles de FABP4 en suero son significativamente mayores en mujeres que en hombres debido posiblemente a la mayor cantidad de grasa corporal en las mujeres, ya que existe una fuerte y dependiente correlación entre el nivel de FABP4 y la adiposidad (Ishimura et al., 2013; Xu et al., 2006).

FABP4 carece de una secuencia señal secretora N-terminal que es necesaria para la vía secretora clásica, es decir, la vía dependiente del RE-Golgi. Sin embargo, las proteínas también se pueden secretar activamente en células eucariotas a través de vías independientes del RE-Golgi (Nickel and Rabouille, 2009).

Estudios previos demostraron que la secreción de FABP4 no estaba modulada por el tratamiento con brefeldina A y monensina, inhibidores de la secreción de proteínas al bloquear el tráfico vesicular en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, lo que indica un mecanismo de secreción no clásica para FABP4 (Cao et al., 2013, Kralisch et al., 2014).

Cerca de 100 artículos han sido publicados relacionando los niveles plasmáticos de FABP4 con diferentes patologías y casi la mitad de estas publicaciones identificaron una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de FABP4, la obesidad y la diabetes tipo 2. Uno de los estudios más importantes fue un análisis transversal de 3.658 individuos dentro del “*Framingham Heart Study*”, en el que se correlacionaron el aumento de los niveles plasmáticos de FABP4 con el aumento del índice de masa corporal (IMC), la resistencia a la insulina y la dislipidemia (Kaess et al., 2012).

En otros estudios propusieron que los niveles de FABP4 en plasma pueden predecir el desarrollo de la diabetes tipo 2 independiente de tener obesidad (Tso et al., 2007), predicen la muerte precoz en pacientes con enfermedad cerebrovascular (Tso et al., 2011) y son elevados en los pacientes con el síndrome grave de apnea obstructiva del sueño (Balci et al., 2012).

En resumen, existen diversas evidencias de que hay un vínculo entre los niveles de FABP4, obesidad y enfermedad metabólica circulante.

Dada la amplia gama de asociaciones fisiopatológicas con los altos niveles de FABP4 circulante, es probable que las funciones de FABP4 sean pleiotrópicas (Figura 13). La forma circulante de FABP4 puede funcionar como una hormona y regular la producción de glucosa hepática. Además esta forma de la proteína regula los lípidos como el ácido palmitoleico, también afecta a la acción de la insulina, el metabolismo de los lípidos hepáticos y la función cardíaca. Otras posibles funciones de la FABP4 circulante son la regulación del crecimiento de células tumorales, las funciones de las células inmunes, la migración endotelial, la contracción de los cardiomiocitos y la secreción de insulina (Hotamisligil and Bernlohr, 2015).

Todos estos hallazgos apoyan la idea de que FABP4 circulante no sólo es un potente marcador biológico sino que también desempeña un papel importante como un adipocina, en el desarrollo del síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares.

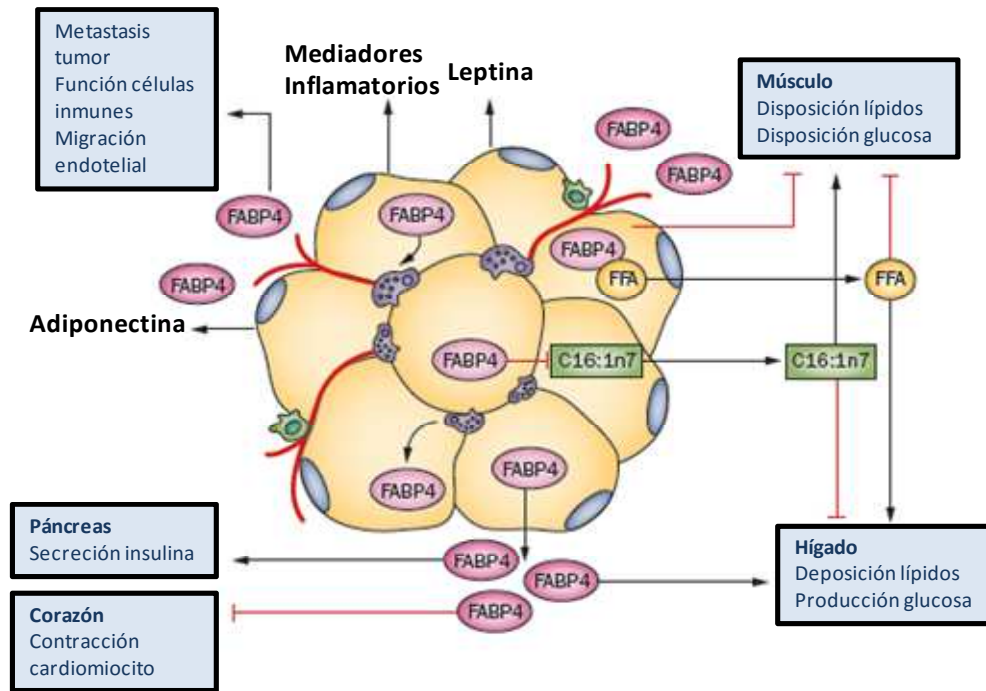


Figura 13: Efectos pleiotrópicos de FABP4 circulante.

Modificado de Hotamisligil et al, Nat Rev Endocrinol 2015(Hotamisligil and Bernlohr, 2015).

4.4 FABP4 como diana terapéutica

Gran parte de la investigación que rodea la actividad terapéutica de las FABPs se ha centrado en la FABP4. Estos estudios se han basado en modelos animales de obesidad, la DM y las enfermedades cardiovasculares, así como los estudios de asociación genética y estudios longitudinales en seres humanos de los niveles de FABP4 en plasma que se asocian con el riesgo de enfermedad y el pronóstico adverso. Las similitudes en estudios celulares, moleculares y bioquímicos entre los seres humanos y los sistemas modelo podrían ser un enfoque terapéutico útil para abordar la función de FABP4 en estas enfermedades metabólicas crónicas.

Los pacientes con alteraciones metabólicas son tratados con una familia de fármacos ya comercializados, las Tiazolidinedionas (TZD) tales como Ciglitazona y Rosiglitazona, que son agonistas del factor de transcripción nuclear PPAR γ , y se utilizan como antidiabéticos en la resistencia a la insulina (Spiegelman, 1998, Lehmann et al., 1995). Como hemos dicho, PPAR γ es el único miembro de una familia de receptores nucleares/factores de transcripción (PPAR), que se encuentra expresado en altos niveles específicamente en tejido adiposo y que se ha demostrado es un importante mediador del proceso adipogénico (Chawla et al., 2001).

Se ha podido demostrar que las TZD (Pioglitazona y Rosiglitazona) tienen propiedades anti-inflamatorias más allá de sus acciones primarias relacionadas con la homeostasis de la glucosa. Las TZD actúan a nivel de PPAR γ secuestrando ácidos grasos en el adipocito y mejorando la sensibilidad a la insulina sistémica. Sin embargo, han demostrado una tolerabilidad limitada y efectos adversos (Quinn et al., 2008, Hauner, 2002, Bodles et al., 2006).

Un trabajo reciente propone que tanto JNK como FABP4 podrían ser buenos objetivos terapéuticos para desórdenes metabólicos relacionados con la obesidad y aterosclerosis (Hui et al., 2010). En este estudio FABP4 inducida por LPS potencia la inflamación, formando un bucle de retroalimentación positivo con la cascada de señales de JNK. En respuesta al estímulo LPS, se activa JNK y aumenta la expresión FABP4 por la activación de la fosforilación de c-Jun, que se une a un elemento AP-1 sumamente conservado dentro del promotor FABP4 y aumenta la transcripción génica.

JNK puede causar resistencia a insulina en macrófagos indirectamente, mediando la producción inducida de citoquinas proinflamatorias, que provocan la inflamación local y sistémica. La interrupción de este bucle por la inhibición molecular o farmacológica de FABP4 o de JNK causa un efecto similar en la atenuación de la activación JNK y la producción de citoquinas proinflamatorias (Figura 14).

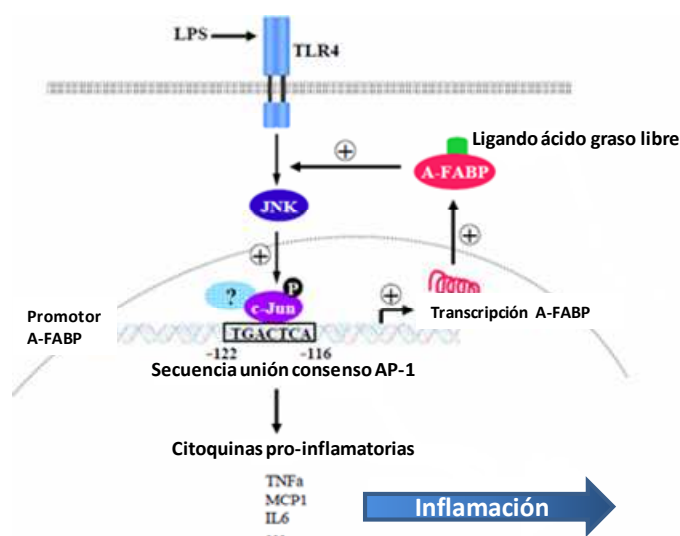


Figura 14: Representación esquemática de la cascada de señalización de JNK.
Modificado de Hui et al, J Biol Chem 2010(Hui et al., 2010).

El empleo de una pequeña molécula inhibidora de JNK para tratar el problema de metabolismo relacionado con la obesidad y la aterosclerosis afronta varios desafíos:

- existen tres isoformas de JNK implicadas en una amplia gama de funciones biológicas, como el crecimiento celular, la diferenciación y apoptosis.

- JNK1 y JNK2 son expresados en casi todas las células y tejidos, y parece difícil desarrollar un inhibidor que inhiba JNK específicamente en el tejido adiposo o macrófagos.

En cambio, los inhibidores de FABP4 pueden tener una selectividad más favorable que inhibidores JNK, ya que la expresión de FABP4 está restringida principalmente a adipocitos y macrófagos.

Dada la implicación demostrada de FABP4 en la regulación de la respuesta inflamatoria y del TNF- α en la resistencia a la insulina, agentes farmacológicos que modifiquen la función de FABP4 pueden ser una oportunidad terapéutica para muchos componentes del síndrome metabólico.

4.4.1. Inhibidores químicos de FABP4

FABP4 actúa en la interfaz de las vías inflamatorias y metabólicas en los adipocitos y macrófagos y juega un papel muy importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina, diabetes y la aterosclerosis. Por tanto, la inhibición química de FABP4 podría ser una estrategia terapéutica contra las enfermedades metabólicas y cardiovasculares. El compuesto **BMS309403**, es uno de los inhibidores químicos más específicos de FABP4. Se trata de una pequeña molécula activa por vía oral e interactúa con el ácido graso que está unido a FABP4 inhibiendo la unión de la proteína al ácido graso endógeno (Figura 15).

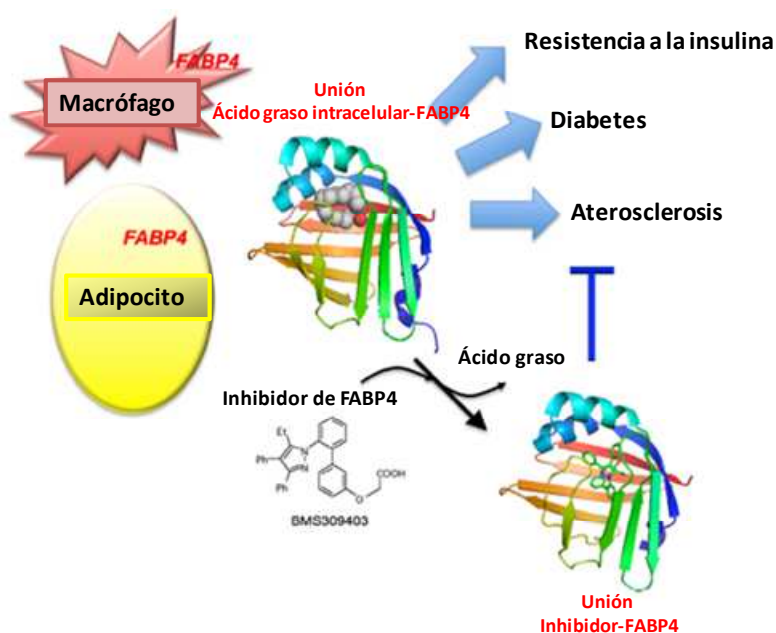


Figura 15: Asociación de FABP4 en los adipocitos y macrófagos con enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Modificado de Furushahi et al, Clin Med Ins. Cardiol 2014(Furushahi et al., 2014).

Además, estudios cristalográficos identificaron las interacciones específicas de BMS309403 con residuos clave, tales como Ser53, Arg106, Arg126 y Tyr128, dentro de la zona de unión al ácido graso demostrando *in vitro* la alta afinidad y selectividad de unión a FABP4 sobre otros FABPs (Figura 16) (Sulsky et al., 2007).

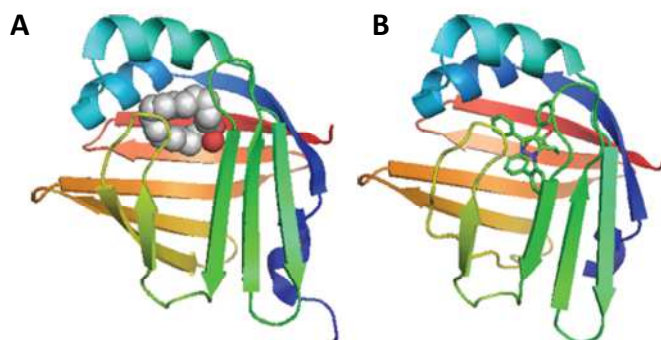


Figura 16: Unión de FABP4 con un ácido graso o una molécula pequeña como es un inhibidor.(A) FABP4 humana se une a un ácido graso endógeno, el ácido palmítico. (B) El complejo cristalizado de FABP4 humano unido a un inhibidor sintético de FABP4, BMS309403. La molécula inhibidora ocupa la zona de unión interna de FABP4 con los ácidos grasos endógenos impidiendo su unión. Modificado de Furuhashi et al, Int J Inflamm 2011(Furuhashi al., 2011).

El compuesto BMS309403 mejora el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina tanto en el modelo de ratón que lleva una dieta rica en grasas como los modelos genéticos (ob/ob) de obesidad y diabetes.

Aunque los ratones deficientes en FABP4 no estaban protegidos contra la enfermedad del hígado graso, la inhibición de FABP4 suprime la infiltración grasa en el hígado de forma similar a lo que ocurre con los ratones que tienen el fenotipo FABP4^{-/-} FABP5^{-/-}. Una posible explicación de estos efectos diferentes entre la deficiencia genética de FABP4 y la inhibición química de FABP4, es que no existe compensación de otras FABPs en el tejido adiposo de los ratones tratados con el inhibidor de FABP4. Además el inhibidor químico reduce la extensión de las lesiones ateroscleróticas en los ratones deficientes en ApoE y la formación de células espumosas.

Además, Furuhashi y colaboradores (Furuhashi et al., 2007) demostraron la eficacia del inhibidor químico de FABP4, **BMS309403** en modelos celulares provocando la disminución de la expresión de TNF- α , producida por la línea de monocitos humana THP-1 (Figura 17).

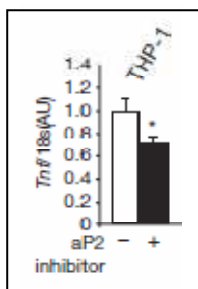


Figura 17: Inhibición de la expresión de TNF- α en la línea celular THP-1 tras el tratamiento con el inhibidor farmacológico de FABP4/aP2. Modificado de Furuhashi et al, Nature 2007(Furuhashi et al., 2007).

Recientemente se han publicado estudios similares con un inhibidor diferente aunque no fue eficaz en el aumento de la sensibilidad a la insulina (Lan et al., 2011).

Es muy difícil inhibir por completo FABP4 en adipocitos ya que se encuentra en grandes cantidades en el tejido adiposo por lo que parece que las pequeñas moléculas desarrolladas hasta ahora para inhibir FABP4 pueden ser más eficaces en los macrófagos y por lo tanto sus efectos *in vivo* pueden estar relacionados con la participación de los macrófagos en el proceso de la enfermedad.

Además, un estudio reciente demostró que la neutralización de FABP4 secretada con anticuerpos bloqueantes, redujo la producción de glucosa hepática y corrigió el fenotipo diabético en el modelo de ratón obeso (Cao et al., 2013).

Se necesitarán estudios futuros para determinar si inhibidores químicos u otros modos de inhibición de FABP4 pueden ser utilizados con seguridad en los seres humanos y demostrar su eficacia para las enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

5. Diálisis peritoneal y riesgo cardiovascular

5.1 Diálisis peritoneal (DP)

La hemodiálisis (HD) y la DP constituyen dos formas de tratamiento sustitutivo renal (TSR) con eficacia depurativa equivalente, pero esencialmente diferentes y con distintas repercusiones cardiovasculares.

En nuestro trabajo nos centraremos en pacientes sometidos a diálisis peritoneal (DP). La DP consiste en el intercambio de solutos y agua entre la sangre del capilar de la membrana peritoneal del paciente y la cavidad abdominal bañada por la solución de diálisis.

La solución de diálisis, contiene concentraciones elevadas de glucosa. La fuerza iónica de esta solución determina el gradiente osmótico, y por lo tanto la cantidad de agua que será retirada

de la circulación sanguínea por efecto convectivo. Las concentraciones comunes de glucosa son 1,5%, 2,5% y 4,25%, siendo la de 1,5% aproximadamente un líquido neutro que ni agrega ni quita líquido al cuerpo y es usada para los pacientes interesados sobre todo en la eliminación de desechos más que en la regulación de fluidos. Concentraciones más altas conducen a mayor extracción de agua.

5.2 Riesgo cardiovascular en pacientes en DP

Las enfermedades cardiovasculares son muy frecuentes entre los pacientes en TSR y constituyen la mayor causa de mortalidad. Su prevalencia oscila entre 3,5 y 50 veces la de la población general.

La DP es una técnica de depuración más lenta que la HD y sin fluctuaciones bruscas, pero en cambio, supone un aporte importante de glucosa que puede ocasionar obesidad y alteraciones del metabolismo de lípidos y de hidratos de carbono, que pueden contribuir a empeorar la enfermedad cardiovascular (Wang, 2007). Los pacientes que siguen este tratamiento pueden teóricamente sufrir con el tiempo DM2, obesidad, complicaciones cardiovasculares, todas ellas enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (Figura 18).

Sin embargo existen pocos estudios que han examinado las características del síndrome metabólico en pacientes en DP. El síndrome metabólico es el resultado de la interacción entre el tejido adiposo y el resto del organismo. La estabilidad del primero, especialmente el de localización abdominal, asegura un adecuado equilibrio; su inestabilidad induce síndrome metabólico. La inestabilidad del tejido adiposo es dependiente del estado de los macrófagos que conviven con él. La proporción de macrófagos proinflamatorios (M1)/reparativos (M2) conduce a dicha inestabilidad cuando predominan los primeros. Las relaciones entre ambas poblaciones y los adipocitos se establecen en parte por moléculas tipo FABPs.

La carga de glucosa de la diálisis peritoneal podría ser capaz de generar alteraciones en todo este equilibrio y determinar mayor aterogeneidad desde el tejido adiposo intraperitoneal que baña, generando mayor capacidad de inducir daño cardiovascular. Regular el estado de interrelación mediado por FABPs podría representar una oportunidad antiaterogénica nueva en un modelo hiperactivado como el que nos ocupa.

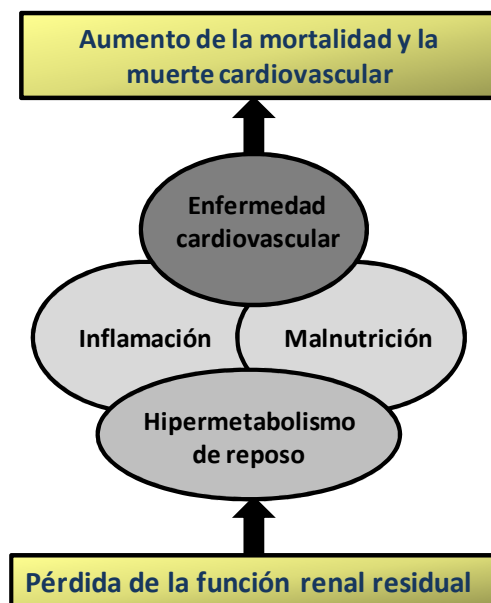


Figura 18: Mecanismos y asociación entre la función renal residual y la mortalidad de los pacientes en diálisis peritoneal. Modificado de Wang et al, Perit Dial Int 2007(Wang, 2007).

Objetivos

HIPÓTESIS

Nos planteamos que distintos compuestos derivados del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico serían inhibidores de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α a través de la unión con FABP4, bloqueando las rutas proinflamatorias en la línea celular THP-1 y en células primarias como monocitos/macrófagos y adipocitos.

Por todo ello, los objetivos propuestos para esta Tesis Doctoral son:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de distintos compuestos análogos al ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (PSA-3-49) y posibles inhibidores de FABP4/aP2, como supresores de la actividad proinflamatoria en macrófagos y evaluar su repercusión en las interacciones adipocito-macrófago.

OBJETIVOS CONCRETOS

1. Buscar ligandos de FABP4: Bioensayo de producción de TNF- α en células THP-1, PBMCs y monocitos estimuladas con LPS y ensayos de unión a FABP4 recombinante.
2. Analizar funcionalmente compuestos derivados del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (PSA-3-49):
 - 2.1 Como agentes anti-inflamatorios: producción de citoquinas
 - 2.2 Regulación del metabolismo en hepatocitos
3. Explorar las capacidades del compuesto EBM T78d derivado de la sal piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indolinio (EMB-12) como agente anti-inflamatorio:
 - 3.1 *In vitro*
 - 3.2 *In vivo*
4. Estudiar la proteína FABP4 como marcador de riesgo cardiovascular y del síndrome metabólico en pacientes en diálisis peritoneal.

Material y Métodos

1. Compuestos sintéticos utilizados en el estudio

1.1. Compuestos derivados de ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico PSA-3-49

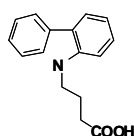
En la Unidad de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá de Henares se sintetizaron un total de 22 compuestos químicos, partiendo del compuesto de referencia ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico previamente publicado (Lehmann et al., 2004) y que en adelante llamaremos PSA-3-49 (Figura 19 A).

Tomando como referencia dicho compuesto, con objeto de estudiar la influencia de un nitrógeno extra en la molécula se sintetizaron las carbolinas (Figura 19 B), estructuras más solubles que el carbazol (Figura 19 A). Dependiendo de donde se encuentre el nitrógeno existen 4 tipos de compuestos: alfa-, beta-, gamma- y delta, algunos de ellos de la familia PSA tienen el núcleo cargado como: PSA-3-61 (delta-carbolina), PSA-3-62 (gamma-carbolina), PSA-3-63 (beta-carbolina), PSA-3-64 (gamma-carbolina), PSA-3-65 (alfa-carbolina), PSA-3-66 (gamma-carbolina).

Además se sintetizaron tres compuestos derivados del PSA-3-64 (Figura 19 C) con el fin de analizar la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada.

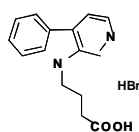
A.

PSA-3-49

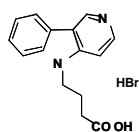


B.

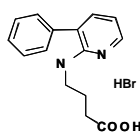
PSA-3-31



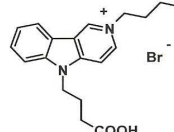
PSA-3-59



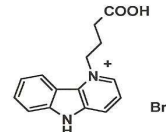
PSA-3-58



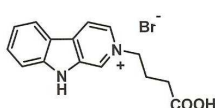
PSA-3-62



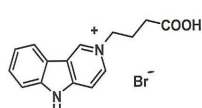
PSA-3-61



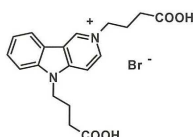
PSA-3-63



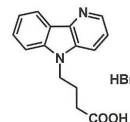
PSA-3-64



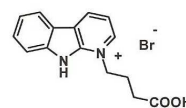
PSA-3-66



PSA-3-75

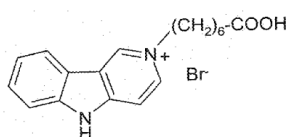


PSA-3-65

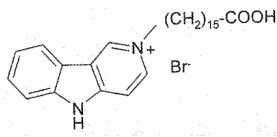


C.

PSA-5-64



PSA-5-70



PSA-6-6

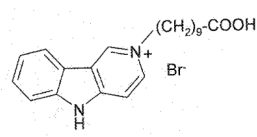


Figura 19: Estructura molecular de los distintos compuestos sintetizados. A) Estructura molecular del compuesto de referencia PSA-3-49. B) Estructura molecular de los compuestos sintetizados a partir del compuesto de referencia PSA-3-49. C) Estructura molecular de los compuestos sintetizados a partir del compuesto PSA-3-64.

1.2. Otros compuestos similares a PSA-3-49 utilizados en los ensayos de unión a FABP4

Se estudiaron nueve compuestos con estructuras similares a la de los compuestos anteriores en el ensayo de Unión a FABP4 que se describe más adelante (Figura 20).

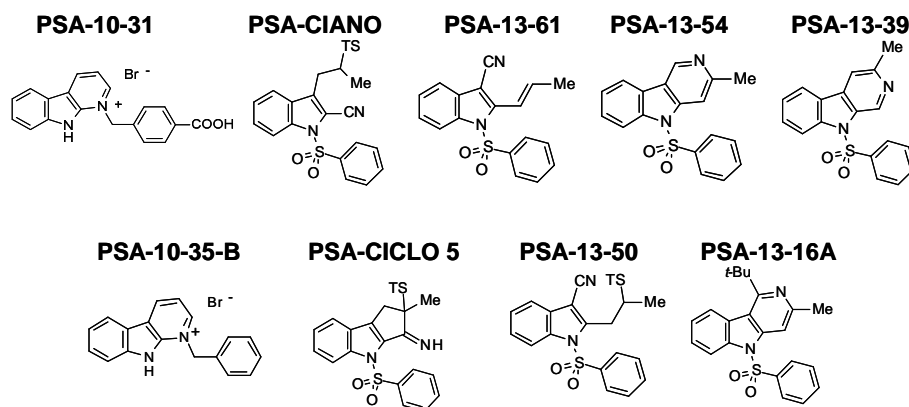


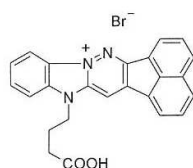
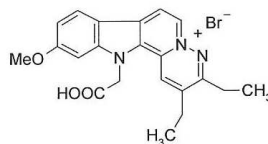
Figura 20: Estructura molecular de los compuestos derivados de la familia PSA .

1.3. Compuestos similares a PSA-3-49 con anillos benzídicos

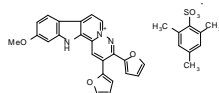
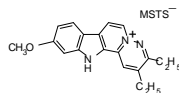
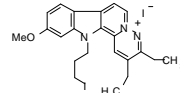
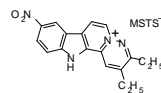
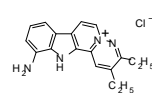
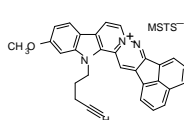
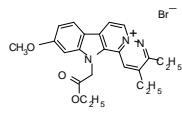
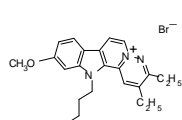
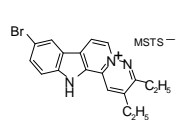
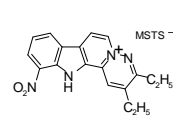
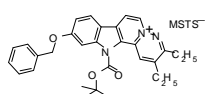
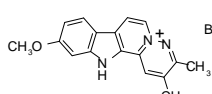
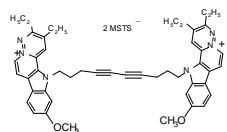
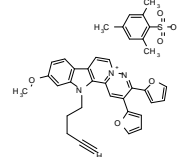
Se desarrolló otra familia de compuestos que conservan la estructura madre del compuesto de referencia, añadiendo anillos benzídicos (Figura 21 A).

El compuesto EMB-9 es una sal derivada de acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-*b*]bencimidazolio y el compuesto EMB-12 es una sal derivada de piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indolinio. A partir de EMB-12 (Figura 21 B) y EMB-9 (Figura 21C) se sintetizaron 20 compuestos adicionales.

A.

EMB-9**EMB-12**

B.

EBM -002**EBM -T9****EBM -011****EBM -82a****EBM -T83b****EBM -24****EBM -T59****EBM -T60****EBM -T82c****EBM -82b****EBM -T76h****EBM -T78d****EBM -51****EBM -23**

C.

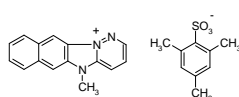
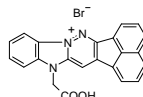
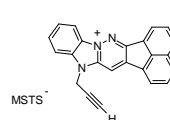
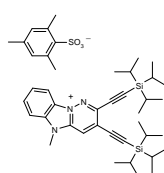
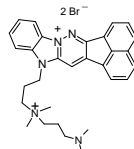
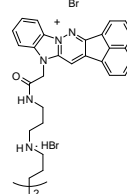
EBM-007**EBM-008****EBM-71h****EBM-917****EBM-455****EBM-T35b**

Figura 21: Estructura molecular de los compuestos sintetizados. A) Estructura molecular de EMB-9 y EMB-12. B) Serie de compuestos de la Familia de EMB-12. C) Serie de compuestos de la Familia de EMB-9.

Los compuestos derivados de EMB-9, EMB-12 y PSA-3-49 son tres familias distintas que se diferencian en su estructura pero se relacionan entre sí porque tienen núcleos con carga positiva (aunque como se indicó anteriormente existen algunos compuestos PSA no cargados).

2. Obtención de PBMCs y sueros de donantes sanos

Se obtuvieron PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) y sueros a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos. Se recogieron como mínimo 10 ml de sangre mediante venopunción en tubos estériles con EDTA. También se utilizaron concentrados de leucocitos (Buffy Coats) procedentes del Centro de Transfusión de la Cruz Roja de Madrid.

Las PBMCs se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (*Amersham Biosciences*) y los sueros se obtuvieron mediante centrifugación de 5ml de sangre periférica en tubos de coagulación.

3. Líneas celulares y cultivo de células primarias

Tanto la línea pro-monocítica humana THP-1 como los cultivos primarios se incubaron en medio de cultivo RPMI-1640 (*Lonza*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) descomplementado (5% FBS en cultivos de THP-1 y 10% FBS en cultivos de PBMCs y monocitos) y antibióticos (Peni-estreptomicina y gentamicina).

Las líneas celulares COS-7 (línea epitelial de riñón de mono), HEK 293 (células embrionarias de riñón humanas), HEPA (línea hepatocitos humanos) y 3T3-L1 (línea de fibroblastos de ratón) se cultivaron en medio DMEM (*Lonza*) con 10% suero fetal bovino (FBS) (*Lonza*) descomplementado.

4. Aislamiento de monocitos de sangre periférica y diferenciación a células dendríticas

Se purificaron células CD14+ a partir de PBMCs de donantes sanos utilizando microesferas magnéticas asociadas a anticuerpos anti-CD14 humano (*Miltenyi Biotec*).

Las separaciones se realizaron con el sistema automático AutoMacs o de forma manual con columnas magnéticas (*Miltenyi Biotec*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se verificó mediante citometría de flujo que en todos los casos la pureza era superior al 90% en las fracciones celulares separadas.

En algunos experimentos los monocitos se purificaron mediante adherencia a plástico. Para ello, PBMCs se incubaron durante una hora a 37° C en RPMI-1640 sin suero y se lavaron con PBS para eliminar restos celulares.

Para la diferenciación a células dendríticas inmaduras (iDCs), la fracción adherente se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS descomplementado, GM-CSF (500u/ml) (*Peprotech*) e IL-4 (100u/ml) (*Peprotech*) durante 2 días, posteriormente se añadió medio fresco con las mismas concentraciones de GM-CSF e IL-4 y se prolongó la incubación durante 3-4 días más. Se verificó mediante citometría de flujo que la población obtenida presentaba un fenotipo de iDCs caracterizado por la pérdida de expresión del receptor CD14 y la adquisición de los marcadores celulares CD83, DC-SIGN y CD1a.

5. Células mesenquimales y adipocitos

El aislamiento de las células madre derivadas de tejido adiposo se realizó a partir de liposucciones de donantes sanos, previa firma de un consentimiento informado. Esta técnica permite la disgregación mecánica del tejido. Las muestras de lipoaspirado se recogieron en jeringas con un volumen aproximado de 50ml. Se procesaron en condiciones de esterilidad en cabinas de flujo laminar vertical y tras dos lavados con tampón fosfato salino (PBS) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) se centrifugaron a 1650 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos de sangre y posteriormente se digirieron con colagenasa tipo I (*Gibco®, Invitrogen™ Life Technologies™, San Diego, CA, EEUU*) (0,1% en PBS) durante 120 minutos a 37° C y agitación suave. Transcurrido este tiempo, se lisaron los eritrocitos durante 5 minutos y a continuación se lavó con PBS centrifugando a 1650 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos de enzima y de eritrocitos.

Las células fueron resuspendidas en 10 ml de DMEM/10% FBS descomplementado y se sembraron en frascos de cultivo de 25cm² (*Corning Inc., Corning, NY, EEUU*) a 37°C y 5% CO₂.

A las 24-48 horas de incubación los frascos se lavaron con PBS y se añadió medio nuevo, descartando así las células no adherentes y los fragmentos celulares. Las células adheridas al plástico se cultivaron durante varios días más hasta que llegaron a confluencia en cuyo caso se tripsinizaron y se cambiaron a frascos de mayor volumen hasta tener las células suficientes para empezar el proceso de diferenciación o para la realización de los experimentos con células mesenquimales de tejido adiposo (preadipocitos). El medio de cultivo se renovó cada 3 o 4 días.

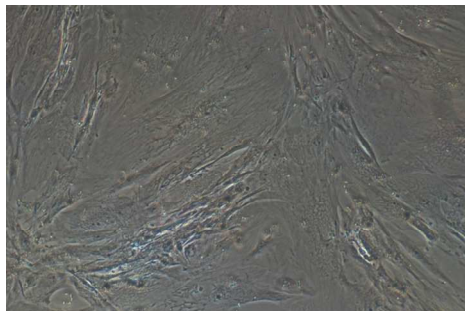
El fenotipo de las poblaciones así obtenidas se analizó por citometría de flujo estudiando la expresión de marcadores específicos de superficie de las células expandidas (CD105+, CD90+, CD13+, CD34-, CD31-, CD45- y CD14-).

5.1 Diferenciación adipogénica

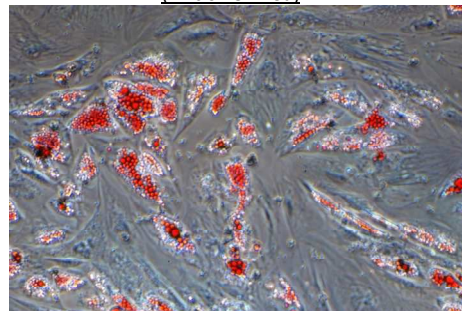
Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 6×10^4 células/pocillo y se mantuvieron 24 horas en cultivo con DMEM/10% FBS descomplementado. Al día siguiente se cambió el medio a medio de diferenciación adipogénico (DMEM/10% FBS suplementado con 0,5 mM isobutil-metilxantina (*Sigma-Aldrich*), 1 μ M dexametasona (*Sigma-Aldrich*), 10 μ M insulina (*Actrapid®*, *NovoNordisk A/S*, *Bagsværd*, *Dinamarca*) y 1 μ M indometacina (*Sigma-Aldrich*)) durante 14 días, renovándolo cada 2 días (Zuk y col., 2002).

Tras fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, la acumulación de lípidos se visualizó mediante la tinción con Oil Red O (ORO) (*Sigma-Aldrich*) (0,5% ORO/ 60%isopropanol) durante 20 minutos en agitación suave. El exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con PBS. Las células se observaron en un microscopio invertido de contraste de fases Nikon DIAPHOT-TMD y se fotografiaron con cámara Nikon D80 acoplada al microscopio.

PRECURSORES MESENQUIMALES SIN DIFERENCIAR



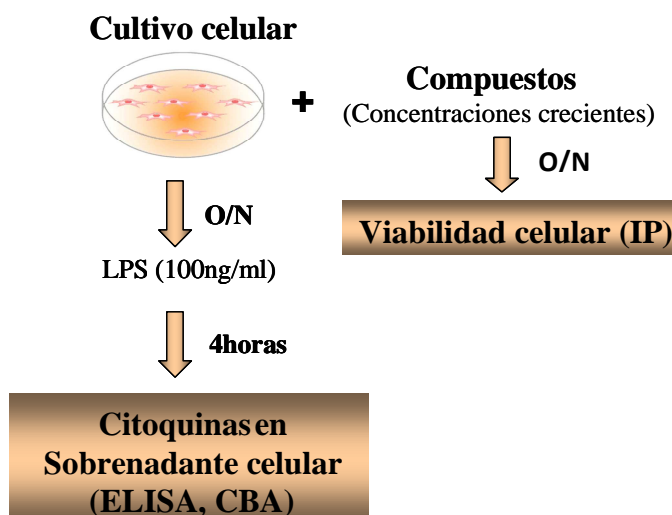
ADIPOCITOS TRAS 15 DÍAS DE DIFERENCIACIÓN
(Tinción Oil-Red)



Además diferenciamos la línea de fibroblastos de ratón 3T3-L1 durante 2 semanas a adipocitos. Los fibroblastos se cultivaron hasta llegar a confluencia a 37°C con medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos. Después de llegar a confluencia (día 0), la diferenciación de fibroblastos a adipocitos se indujo con metilhidroxibutilxantina (MIX, 0,5 mM), dexametasona (DX, 0,25 μ M) e insulina (5 μ g/ml) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al segundo día se cambió el medio adicionado con insulina (5 μ g/ml), sin MIX, sin DX y se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio sin suplemento de insulina se reemplazó cada dos días.

6. Bioensayo para la selección de compuestos inhibidores de TNF- α

Tanto la línea celular THP-1 como los cultivos primarios se pre-trataron con los distintos compuestos a diferentes concentraciones durante 18 horas, tras las cuales se estimularon los cultivos con LPS (100ng/ml) (*Sigma*) durante 4 horas.



Para los experimentos con células primarias, se siguió el mismo protocolo disminuyendo la concentración de LPS a 10 ng/ml durante 4 horas. El tratamiento con LPS (50ng/ml) fue de 24 horas en el caso de las células mesenquimales y los adipocitos maduros previo tratamiento con los compuestos seleccionados.

En algunos experimentos las células THP-1 se diferenciaron a monocitos maduros utilizando PMA (5ng/ml) (*Sigma*) durante 7 horas y posteriormente se añadieron los compuestos siguiendo el esquema anterior. El tiempo total de incubación con PMA fue de 24 horas.

En algunos experimentos con monocitos purificados y células dendríticas (iDCs) se utilizó como estímulo poly (I:C) a 10µg/ml O/N (*Sigma*) siguiendo el mismo esquema experimental.

Tomando como referencia la concentración de TNF- α secretada al medio por células estimuladas durante 4 horas con 100 ng/mL de LPS en ausencia de compuesto, se ha calculado el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones testadas del compuesto EBM T78d en cada experimento y se ha calculado la media del porcentaje de inhibición para cada concentración en los N experimentos realizados. Con estos valores se ha elaborado una recta de regresión para interpolar el 50% de inhibición. Los valores de IC₅₀ de los demás compuestos se obtuvieron de la misma forma.

7. Ensayo de unión de FABP4 a ligando: Ensayo de polarización de fluorescencia

Se utilizó el kit FABP4 Inhibitor/ligand Screening Assay (*Cayman Chemical Company*) siguiendo las instrucciones del fabricante y un ensayo puesto a punto en el laboratorio siguiendo el protocolo previamente descrito (Kane and Bernlohr, 1996).

En cada pocillo de una placa de 96 pocillos opaca se añadió la siguiente mezcla: 40 µl de tampón (200mM K_2HPO_4 pH 7,2 y 800mM KCl), 25 µl de la proteína FABP4 (600nM) (*Cayman Chemical Company*), 25 µl del ligando fluorescente 1,8-ANS (500nM) (*Molecular Probes*) y 10 µl de cada inhibidor (PSA-64, PSA-65, PSA-49 y EBM-T78d) en un rango de concentraciones de 0,25µM-10µM. Se incubó la placa en oscuridad, 10 min a temperatura ambiente con agitación leve. La fluorescencia se midió a 475 nm en el lector de placas Synergy 4.

Se analizaron las medias de triplicados con el programa *GraphPad PRISM* mediante interpolación de los datos en una curva estándar tipo RIA. Se utilizó la regresión no lineal y se aplicó el modelo log (inhibidor) frente a respuesta (pendiente variable) para estimar la IC_{50} (concentración inhibitoria máxima media) de cada compuesto.

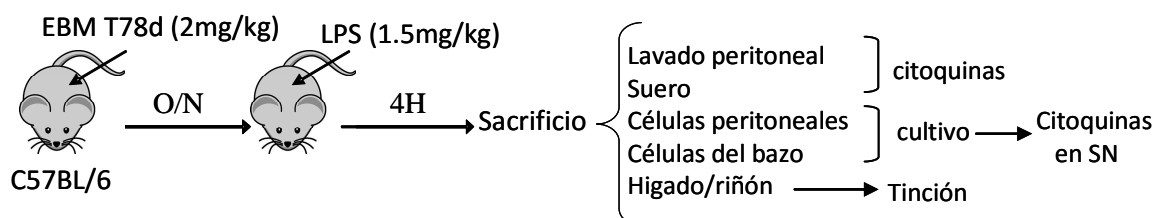
8. Ensayos *in vivo* en modelo animal (ratón)

8.1 Modelo de inflamación inducido por LPS

Se utilizaron ratones hembras C57BL/6J de 11-13 semanas de edad (*Charles-River Laboratories*) mantenidos en el animalario de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz o en el animalario de la Facultad de Medicina (UAM). Los experimentos fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (*IdiPAZ*).

Los ratones se trataron durante 1 noche con el compuesto EBM-T78d (2mg/kg) mediante inyección intra-peritoneal y durante 4 horas con LPS (1,5mg/kg) y otra dosis del compuesto en el grupo control que no lleva LPS. Posteriormente se sacrificaron mediante dislocación cervical y se inyectó 1ml de PBS en la cavidad peritoneal. El lavado peritoneal se centrifugó y se midieron las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL1- β e IL-6) en el lavado peritoneal y en los sobrenadantes de las células peritoneales cultivadas *in vitro* durante una noche sin re-estimular mediante citometría de flujo siguiendo las instrucciones del fabricante (*FlowCytomix Multiple Analyte Detection Mouse Th1/Th2 10 plex kit, eBioscience*). Además se midieron TNF-

α , MCP-1 e IL-6 en suero y en los bazo extirpados de cada ratón. Las células del bazo se cultivaron en DMEM/10% FBS a 200.000 células/ml tratándose O/N con el compuesto EBM-T78d en presencia o ausencia de LPS 10ng/ml durante 4 horas analizando los niveles de la citoquinas TNF- α , MCP-1 e IL-6 en el sobrenadante celular.



También se obtuvieron macrófagos de la médula ósea (fémur) de ratón, se pre-trataron 12 horas con el compuesto EBM T78d (1 μ M) y posteriormente se estimularon durante 4 horas con LPS (10ng/ml). Se midieron las concentraciones de MCP-1 y TNF- α en el sobrenadante celular de los macrófagos.

Se estudió por citometría el fenotipo de las células peritoneales y los esplenocitos usando los anticuerpos de ratón CD19-FITC (BD), CD3-APC (BD), F4/80-PE-Cy7 (eBioscience), CD11b-PE (BD) y Gr1-APC (BD).

8.2 Modelo de diálisis peritoneal (DP)

Se ensayó el compuesto EBM-T78d en un modelo de diálisis peritoneal en ratón según González-Mateo y colaboradores (Gonzalez-Mateo et al., 2009), en el que se diseñó un catéter unido a un puerto de acceso vascular (Pennyport) (Access Technologies, USA). Este catéter consta de 10 agujeros situados en el extremo del mismo, que permiten la salida del líquido, previniendo posibles obstrucciones. Tras anestesiarse los ratones intraperitonealmente con 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina e isoflurano como anestesia inhalatoria, se introdujo el catéter en la cavidad peritoneal. El puerto de acceso vascular se colocó subcutáneamente en el lomo de los animales para evitar pinchar reiteradamente el peritoneo de los ratones al inyectar el líquido, reduciendo el riesgo de infecciones y hemoperitoneo y se evitó causar una inflamación debida al procedimiento.

Transcurrida una semana de recuperación tras la operación, comenzó el tratamiento con el líquido de diálisis Stay Safe 4,25% (tampón de lactato con 4,25% de glucosa, de Fresenius

Medical Care, Alemania). Durante 1 mes se inyectó 1 mL de líquido diariamente en la cavidad peritoneal de los ratones junto con el compuesto EBM T78d en los grupos correspondientes a distintas dosis. Al finalizar el experimento se sacrificaron los animales y se analizaron las citoquinas más representativas en el lavado peritoneal y el sobrenadante de las células peritoneales puestas en cultivo sin estimular. Además se recogió hígado, riñón, grasa epididimal, se analizó el grosor de la membrana peritoneal y se contabilizaron las células del infiltrado con el programa Image-Pro-Plus del microscopio (*Leika CTR6000*).

8.3 Estudios histológicos

Inmediatamente después del sacrificio de los animales se les extrajo el hígado y el riñón, que se lavó con una solución de cloruro sódico 0,9% (*Meinsol®*, *Fresenius Kabi*) y se fijó en formaldehído 10% durante al menos 48 horas. Una vez fijado, el tejido se deshidrató mediante lavados con alcohol de concentración creciente y xilol, hasta su inclusión en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en el microtomo en secciones de 5µm, que se recogieron en portaobjetos de cristal recubiertos de silano y se mantuvieron a 37°C antes de teñirlos.

8.3.1 Tinción con hematoxilina-eosina

Para teñir los cortes con hematoxilina-eosina, éstos se desparafinaron en xilol durante 5 minutos y se rehidrataron después mediante baños de 5 minutos en alcoholes de concentración decreciente, hasta pasar a una cubeta con agua destilada. A continuación, los portaobjetos se introdujeron en otro recipiente con hematoxilina de Harris (*Merck*) durante 20 segundos y se lavaron dos veces con agua corriente antes de pasarlos a una cubeta con eosina (*Merck*) al 0,15% en etanol-acético (ácido acético 4% en etanol de 96º) donde se tiñeron durante 1 minuto. El exceso de colorante se eliminó tras 4 minutos de inmersión en 96% ETOH y los cortes se deshidrataron de nuevo para montarlos con cubreobjetos de cristal utilizando medio de montaje DPX.

8.3.2 Tinción con tricrómico de Masson

Los cortes se tiñeron mediante tricrómico de Masson para analizar el grosor de la membrana peritoneal mediante microscopía óptica (*Leika CTR6000, with a Leika Microsystems LAS-AF6000*).

Los cortes se desparafinaron en xilol en este caso durante 30 minutos y se rehidrataron después de igual manera que la tinción con hematoxilina-eosina. Para el material fijado en

formaldehído se realizó el montaje en Bouin(*Sigma*) toda la noche a RT. A continuación los cortes se enfriaron, se lavaron con agua destilada hasta que desapareció el color amarillo y se tiñeron con hematoxilina durante 5 minutos. Se lavaron los portas con agua corriente 1 minuto y con agua destilada varias veces. Posteriormente se tiñeron las muestras con Fuscina ácida durante 2-5 minutos y se lavaron dos veces con agua destilada tiñéndose después los portas con la solución de ácido fosfomolibdico- fosfotúngstico durante 10 minutos. Sin lavar se tiñeron con azul de anilina 5 minutos y después se lavaron con agua destilada de nuevo. Por último se añadió ácido acético al 1% durante 2 minutos, se lavó, se deshidrató, se aclaró y se montó con DPX.

9. Citometría de flujo

Las células se trataron con γ -globulina humana (50 $\mu\text{g/ml}$) para bloquear la unión inespecífica a receptores Fc, se lavaron y se procedió a la tinción de las mismas mediante inmunofluorescencia directa, indirecta o intracelular de TNF- α .

En las inmunofluorescencias directas las células se incubaron con anticuerpos conjugados directamente a fluorocromos. Para las inmunofluorescencias indirectas las células se incubaron con concentraciones saturantes del anticuerpo específico, se lavaron, se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo F(ab')₂ anti-ratón conjugado a FITC (*Dako Cytomation Glostrup, Denmark*), se bloqueó el exceso de anticuerpo secundario con suero de ratón y se añadieron anticuerpos conjugados directamente a fluorocromos.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos humanos: CD3-PerCP (*BD*) y CD14-FITC ,anti-TNF- α -PE, IgG1-PE y CD11b-FITC de *Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Germany)*.

La viabilidad celular se determinó mediante citometría de flujo tras la incubación de los cultivos con yoduro de propidio (IP) a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (*Sigma*).

El análisis mediante citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur mediante el software CellQuest (*BD Bioscience, San José, CA, USA*).

10. ELISA

La determinación de las concentraciones de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el sobrenadante de los cultivos celulares se realizó mediante Human TNF ELISA Set (*BD Bioscience*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de la proteína recombinante humana.

La absorbancia se midió a 450 nm en el lector de placas Synergy 4 analizando los resultados con el software Gen 5 (*Biotech*).

Se midieron otras citoquinas con la técnica de ELISA como CCL18 (*R&D Systems*), Leptina (*R&D Systems*), FABP4 (*BioVendor*) y TNF- α de ratón (*BD Bioscience*).

11. CBA (Cytometric bead array)

Para la cuantificación de distintas citoquinas liberadas al medio de cultivo se utilizó la citometría de flujo usando *Cytometric bead array (CBA) Flex Set (BD Biosciences)* siguiendo las indicaciones del fabricante.

Con esta técnica se cuantificaron las siguientes citoquinas humanas: IL-6, IL1- β , IL-8, IL-12, IL-10, TNF- α y MCP-1. También se analizaron las citoquinas MCP-1 y TNF- α de ratón.

Los archivos procedentes de las muestras adquiridas en el citómetro se analizaron con el software FCAP ArrayTM (*BD Biosciences*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

12. Extracción de ARN Y RT-PCR cuantitativa

Se extrajo el ARN total mediante High Pure RNA Isolation Kit (*Roche*). El ARN se trató con DNAasa I (*Roche*) para eliminar el posible ADN genómico y se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop). A continuación se procedió a la retrotranscripción de 1 μ l de ARN total mediante la incubación con la retrotranscriptasa inversa AMV-RT (*Roche*) durante 1h a 42°C para obtener el ADN complementario (ADNc). La cuantificación de los niveles de expresión génica se realizó mediante la amplificación de los ADNc en el termociclador a tiempo real Light Cycler (*Roche*) utilizando Quantimix easy kit (*Biotoools*) o ADN polimerasa (*Roche*).

Los oligonucleótidos que se usaron como cebadores para la PCR, la temperatura de hibridación y el tiempo utilizados se reflejan en la tabla siguiente:

	Oligonucleótidos	Tª (°C)	Tiempo(seg)
β-2-microglobulina (300 pb)	5' cca gca gag aat gga aag tc 3' 5' gat gct gct tac atg tct cg 3'	60	5
FABP4 (160 pb)	5' ctg ggc cag gaa ttt gac gaa 3' 5' cat gac gca ttc cac cac cag 3'	59	10
TNF-α (221 pb)	5' gaa agg aca cca tga gca ctg 3' 5' tga tta gag aga gct ccc tgg 3'	62	10
ARF5 (104 pb)	5' att ctc atg gtt ggc ttg gat g 3' 5' ttc tac att gaa gcc tat ggt tg 3'	56	5
IL8 (219 pb)	5' aag gaa cca tct cac tgt gtg 3' 5' ggt gga aag gtt tgg agt atg 3'	55	10
Luciferasa (155 pb)	5' agg cta tga aga gat acg 3' 5' ata cga cga ttc tgt gat 3'	46	5
IL6 (270 pb)	5' agc cac tca cct ctt cag aac 3' 5' ctt ttg tac tca tct gca cag c 3'	57	5

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en el estudio y sus características.

La cuantificación del número de moléculas de ARN mensajero específico se obtuvo con el programa Light Cycler (*Roche*) mediante la interpolación en una recta patrón previamente realizada con cantidades conocidas de los productos de PCR específicos. El número de moléculas de ARNm por µl de ADNc se normalizó con respecto al número de moléculas de ARNm de β-2-microglobulina/µl o ARF5/µl ADNc de la misma muestra.

13. Obtención de proteína de fusión con proteína verde fluorescente (GFP)

La secuencia del ADNc completo (400pb) de FABP4 se obtuvo mediante RT-PCR a partir de ARN total de grasa de donante sano. Los oligonucleótidos que se usaron fueron: 5'-AA ATG TGT GAT GCT TTT GTA GGT A-3' y 5'-CT TAT GCT CTC TCA TAA ACT CTC-3'.

El producto de PCR se clonó en el plásmido pCR[®]-2.1 (*Invitrogen*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*TA Cloning[®], Invitrogen*). Para obtener el plásmido pCR[®]-2.1 – FABP4 este se transformó en bacterias HL-1 blue (*Invitrogen*) por choque térmico, y las colonias se seleccionaron en medio LB con X-gal, IPTG y ampicilina. Se purificó el plásmido y la naturaleza del inserto se verificó mediante el patrón de digestión enzimática y secuenciación.

A partir de pCR[®]-2.1 –FABP4 se amplificaron por PCR la secuencia del ADNc completo de FABP4 (400pb) en marco de lectura con la secuencia de GFP presente en el plásmido pEGFP-C3 resistente a kanamicina (*Clontech Laboratories*).

Los productos de PCR resultantes se purificaron del gel de agarosa con SpeedTools PCR clean-up Kit (*Biotoools*) y se digirieron con Eco R1 (*Roche*) durante 1 hora a 37°C. Los insertos y los vectores digeridos fueron purificados del gel de agarosa. La ligación con el vector se realizó mediante la incubación con T4-ADNligasa (*Roche*) a 14°C durante toda la noche. El producto de la ligación se transformó en E.coli DH5α competentes. Las colonias se seleccionaron por resistencia a kanamicina, y se analizaron mediante PCR y patrón de digestión con HindIII, BamHI y Kpn-1. Finalmente las construcciones obtenidas se secuenciaron para verificar la secuencia y el marco de lectura.

14. Secuenciación

Los plásmidos se purificaron con “High pure plasmid isolation kit” (*Roche*) y se cuantificaron en un espectrofotómetro. La amplificación por PCR de la secuencia se realizó en un volumen final de 10µl con: 2µl de BigDye® Terminator v 3.1 (*Applied Biosystems*), 1 µl de oligo (M13 reverso, promotor T7 ó primer interno) a 25ng/µl, 200ng de plásmido y agua mili-Q. La reacción de PCR consistió en: 3min-94°C; 25 ciclos (20seg-94°C, 15seg-55°C, 4min-60°C); 5min-72°C; 4°C. La secuencia amplificada se precipitó con etanol 95% y acetato sódico 3M pH 5,2 durante 15 minutos a -20°C. Se lavó con etanol 70% frío. La secuencia fue procesada en ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer de *Applied Biosystems*.

15. Transfección transitoria en COS-7

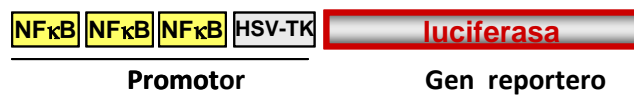
15.1 Transfección con DEAE-Dextrano

La construcción pGFP-FABP4 (1,8 µg) se transfectó en la línea celular COS-7 o HEK 293 mediante el siguiente protocolo: Las células a un 60% de confluencia se lavaron con DMEM sin suero, y a continuación se añadió en cada pocillo la mezcla de transfección (5ml/p100) que contiene: DEAE-Dextrano (*Sigma*) 50mg/ml en PBS, Cloroquina (*Sigma*) 10mM en PBS, y el ADN diluido a 0,25 µg/µl en PBS. Se incubaron 3-4 horas a 37°C y 5% CO₂ y se verificó la formación de vesículas lisosomales al microscopio. Transcurrido dicho tiempo, se retiró el medio y se añadieron 5ml de DMSO 10% en PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con PBS dos veces para eliminar restos de DMSO, y se incubaron 48 horas en DMEM 10% FBS hasta su análisis mediante citómetro de flujo y microscopía de fluorescencia.

15.2 Transfección con Lipofectamina

Además de la transfección con DEAE-Dextrano se utilizó lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) mediante el siguiente protocolo: las células se sembraron el día anterior en placas de 24 pocillos en DMEM 10% FBS sin antibiótico para obtener una confluencia del 80-90%. La mezcla de transfección que contiene 2 μ l de lipofectamina y 0,8 μ g de ADN diluido en DMEM (500 μ l/pocillo) se incubó durante 20 minutos a RT y a continuación se lavaron las células con DMEM sin suero y se añadió en cada pocillo la mezcla de transfección junto con DMEM (500 μ l/pocillo) y se dejó incubando 4-6 horas, a continuación se cambió el medio a DMEM 10 % FBS durante 48 horas.

El DNA plasmídico utilizado en otras transfecciones fue el gen reportero NF κ B-Luc cedido por el Dr Pujol (Departamento de fisiología UAH), que contiene el gen de la luciferasa bajo el promotor de NF κ B.



16. Nucleofección

Las células mesenquimales se transfectaron mediante nucleofección. Una semana antes de la nucleofección se sembraron las células para que en el momento de la transfección estuvieran a un 85% de confluencia, según las recomendaciones del fabricante (*Lonza*).

Para cada transfección, un total de 6×10^5 células se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 μ L de "Human Mesenchymal Stem Cell Nucleofector Solution" (*Lonza*). Se añadieron a la suspensión celular 2 μ g del plásmido pmaxGFP™ o 4 μ g del plásmido pGFP-FABP4.

La mezcla se transfirió a la cubeta de nucleofección y se sometió al programa U-23 en el Nucleofector™ 2b Device (*Lonza*). A continuación, se añadieron 500 μ L de DMEM, previamente a temperatura ambiente y equilibrado, suplementado con FBS 10% descomplementado. Por último, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos que contenían 2,5 mL del mismo medio, en el que se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24-48 horas antes de analizar la expresión de GFP.

17. Análisis de la expresión de GFP in vitro

El análisis de la expresión de GFP in vitro en las células transfectadas con las distintas construcciones se analizó a las 48 horas por microscopía de fluorescencia. La cuantificación de la eficacia de transfección se realizó mediante citometría de flujo. Para ello, las células se tripsinizaron, centrifugaron y lavaron con PBS. La fluorescencia se detectó en el canal FL1-H en un citómetro FACSCalibur (BD Bioscience, San José, CA, USA).

En algunos experimentos las células se fijaron en metanol frío (-20°C) durante 2 min, se lavaron en PBS y para identificar el núcleo celular, se incubaron con Hoechst dilución 1/200 en agua destilada durante 1 min a temperatura ambiente y se lavó con PBS. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (*Leica microsistemas, SA*) y se analizaron las imágenes con CytoVision® (*Applied Imaging*).

18. Western-blot

Para analizar la fosforilación de p38 y JNK, la línea celular THP-1 se cultivó en 80% HL1 para minimizar el porcentaje de suero y reducir la fosforilación basal de las quinasas, en presencia del compuesto EBM T78d durante 18 horas, tras las cuales se estimuló con LPS (100ng/ml) durante 4 horas. Las células se lisaron y se obtuvieron los extractos de proteínas totales.

Para experimentos de inmunoblot las células se lisaron en tampón de lisis NP40 1%, PBS, cocktail de inhibidores de proteasas (*Sigma*) 1x, 1 M NaF, 1 mM Na₃VO₄ (en el caso de proteínas fosforiladas) durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó en una microfuga a 13.000 rpm durante 30 min y se congeló el sobrenadante a -20°C para su posterior utilización. Los extractos de proteína se cuantificaron en un espectrofotómetro mediante el método de Bradford.

Dependiendo del experimento se cargó una concentración de proteína conocida o un volumen de sobrenadante igual en todas las condiciones.

Las proteínas se desnaturalizaron en tampón Laemmli 2X (0,125 M Tris-HCl pH6,8, 4%SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol) durante 5 minutos a 95°C y se resolvieron en un gel SDS-PAGE(8-12 % de acrilamida según el tamaño de la proteína) en condiciones no reductoras.

La electroforesis se realizó en Tris Glicina 5x /0.1% SDS a 20 mA. La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF (*Bio-Rad*), previamente incubada con metanol 100% y agua destilada, se realizó en Tris Glicina 5x /20% metanol durante 1 hora a 200 mA. La membrana

se bloqueó durante 1 hora con PBS/0,5% ECL Prime TM blocking agent (*GE Healthcare UK*) y 0,05% Tween20 a temperatura ambiente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios : anticuerpo monoclonal de ratón anti-pSAPK-JNK (Thr183/Tyr185) dilución 1/10000 (*Cell Signaling Technology*), anticuerpo policlonal de conejo anti-pP38 MAPK (Thr180/Tyr182) dilución 1/8000 (*Cell Signaling Technology*), anticuerpo monoclonal de ratón anti-A-FABP dilución 1/500 (*sc-136150, Santa Cruz Biotechnology, Inc*), anticuerpo monoclonal de ratón anti-P38 dilución 1/1000 (*sc-7972, Santa Cruz Biotechnology, Inc*), anticuerpo policlonal de conejo anti-pAkt (Ser473) dilución 1/1000 (*Cell Signaling Technology*), anticuerpo policlonal de conejo anti-HSA dilución 1/100000 (*Dade Behring*); anticuerpo policlonal de conejo anti-SHP1 dilución 1/1000 (*Cell Signaling Technology*), las diluciones del anticuerpo primario se realizaron en PBS/ 10% de la solución de bloqueo y se incubaron las membranas durante toda la noche a 4°C.

Las membranas se lavaron dos veces, 10 min, en PBS/0,01% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*Chemicon International*) o anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (*Chemicon International*) durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras tres lavados en PBS /0,01% Tween 20 se procedió al revelado de la membrana. La detección del anticuerpo se realizó por reacción quimioluminiscente de la peroxidasa con ECL Select western blotting detection reagent (Luminol y peroxidasa solución) (*GE Healthcare*) para una detección más sensible. La señal de las bandas fue cuantificada utilizando el programa *Quantity One® 1-Danalysis software*.

19. Selección de pacientes

Un total de 31 pacientes (Tabla 3) en diálisis peritoneal fueron seleccionados en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Todos los pacientes tenían una serología negativa para la infección por VIH y carecían de desórdenes hematológicos.

Se recogieron 500 µl de suero de los pacientes a tiempo 0 y trascurridos 2 años desde el inicio de la diálisis y se evaluaron las concentraciones de FABP4, CCL18 y leptina.

Según los antecedentes clínicos de los pacientes se dividieron en aquellos sin enfermedad cardiovascular previa (riesgo 1) y con distintos niveles de riesgo cardiovascular (riesgo 2-5) según variables clínicas relacionadas con el síndrome metabólico (diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, enfermedad vascular periférica) y aumento de riesgo cardiovascular. Los datos demográficos y clínicos de los pacientes se muestran en la Tabla 3.

Paciente	Sexo	Edad	Riesgo	Diabetes	Enfermedad CV	Enfermedad vascular periférica	Obesidad	HTA	DL	Enfermedad de base
1	M	24	1	NO	NO	NO	NO	SI	NO	otras
2	M	66	1	NO	NO	NO	NO	SI	NO	GNC
3	M	43	1	NO	NO	NO	NO	SI	NO	no filiada
4	F	33	1	DM2	SI	NO	NO	SI	SI	PQR
5	F	52	1	NO	NO	NO	NO	SI	NO	enf. Sistémica
6	M	68	1	DM2	NO	NO	NO	SI	NO	GNC
7	M	41	1	NO	NO	NO	NO	SI	NO	GNC
8	F	56	2	NO	NO	SI	NO	NO	SI	no filiada
9	F	55	2	NO	NO	NO	NO	SI	NO	no filiada
10	M	76	2	NO	SI	NO	NO	SI	NO	GNC
11	M	84	2	NO	NO	NO	SI	SI	NO	PQR
12	M	63	2	NO	NO	NO	SI	SI	SI	nefroangioesclerosis
13	M	66	2	NO	NO	NO	NO	SI	NO	uropatía obstructiva
14	F	58	2	NO	NO	SI	NO	SI	SI	uropatía obstructiva
15	F	64	3	NO	SI	NO	SI	SI	SI	nefroangioesclerosis
16	M	68	3	NO	NO	NO	SI	SI	SI	NTI
17	M	54	3	NO	NO	NO	SI	SI	SI	no filiada
18	F	53	3	NO	NO	NO	NO	SI	SI	GNC
19	M	83	4	NO	SI	NO	NO	NO	SI	enf. Sistémica
20	M	41	4	NO	NO	NO	NO	SI	SI	PQR
21	M	59	4	DM2	NO	NO	SI	SI	SI	GNC
22	M	65	4	NO	SI	NO	SI	SI	SI	no filiada
23	M	74	4	NO	SI	NO	SI	SI	SI	nefroangioesclerosis
24	M	55	4	NO	NO	NO	NO	SI	NO	nefroangioesclerosis
25	M	89	5	NO	SI	NO	SI	SI	SI	PQR
26	F	72	5	DM2	SI	SI	NO	SI	SI	DM II
27	M	71	5	DM2	SI	NO	SI	SI	SI	DM II
28	M	49	5	DM1	SI	SI	NO	SI	SI	DM I
29	M	53	5	DM1	SI	SI	SI	SI	SI	DM I
30	M	58	5	NO	NO	SI	SI	SI	SI	uropatía obstructiva
31	M	71	5	NO	NO	NO	NO	SI	SI	GNC

Tabla 3: Selección de pacientes en diálisis peritoneal, sus datos demográficos y clínicos

M: Masculino **F:** Femenino **DM1:** Diabetes mellitus tipo 1 **DM2:** Diabetes mellitus tipo 2 **CV:** Cardiovascular **HTA:** Hipertensión arterial
DL: Dislipidemia **GNC:** Glomerulonefritis crónica **PQR:** Poliquistosis renal **NTI:** Nefritis tubulointersticial

20. Análisis estadístico

Los resultados se muestran como la media de triplicados \pm el error estándar de la media.

Se aplicó el test paramétrico t-Student, el test no paramétrico U-Mann-Whitney (datos no pareados) o test de Wilcoxon (datos pareados) para comparar las medias de variables continuas según el caso. En caso de tener 3 o más variables se utilizó el test estadístico Kruskal-Wallis para comprobar si las diferencias eran estadísticamente significativas. En todos los casos se consideró la diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p fue menor o igual a 0,05.

Resultados

1. Búsqueda de ligandos de FABP4: Análisis del efecto de 36 compuestos sintéticos sobre la producción de TNF- α y ensayos de unión a FABP4 recombinante

Previamente al inicio de este trabajo se había descrito el ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico como un ligando selectivo de FABP4 en un ensayo de polarización de fluorescencia pero sus efectos funcionales no habían sido estudiados (Lehmann et al., 2004).

Con el objeto de encontrar una molécula inhibidora de FABP4, quisimos estudiar el efecto del ligando descrito ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (que en adelante denominaremos PSA-3-49) y de 36 compuestos sintéticos con una estructura molecular similar al mismo. Para ello, nos propusimos desarrollar un modelo de ensayo funcional sencillo y fácilmente reproducible (ver material y métodos).

A nivel molecular, la deficiencia de FABP4 en macrófagos de ratón produce la disminución de la producción de una serie de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-1 β (Hui et al., 2010, Furuhashi et al., 2008). Los mismos autores (Furuhashi et al., 2007) demostraron la eficacia de un inhibidor químico de FABP4 que disminuyó la concentración de la citoquina proinflamatoria TNF- α producida por la línea pro-monocítica humana THP-1 diferenciada a macrófagos con PMA.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS), agonista principal de TLR4, es un potente inductor de la producción de TNF- α en macrófagos. Utilizamos la línea celular pro-monocítica humana THP-1 y células primarias estimuladas con LPS para explorar los efectos de los 36 compuestos sintetizados sobre la producción de la citoquina proinflamatoria característica TNF- α . Para ello, se evaluó la concentración de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo de las células.

1.1 Análisis del efecto del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (PSA-3-49) y de 13 compuestos sintéticos derivados del mismo (Familia PSA) sobre la producción de TNF- α estimulada con LPS

1.1.1 Respuesta de la línea celular THP-1

Los monocitos y macrófagos son los principales productores de TNF- α . En nuestro estudio para hacer una primera exploración utilizamos la línea THP-1 cultivada con concentraciones crecientes de una primera serie de 13 compuestos sintéticos derivados del compuesto PSA-3-

49 propuesto como inhibidor selectivo de FABP4 (Lehmann et al., 2004) y analizamos la posible actividad inhibidora sobre la liberación de TNF- α .

A) Viabilidad celular

En primer lugar se evaluó la toxicidad de los 13 compuestos. Para ello se determinó la viabilidad celular de la línea THP-1 preincubada durante 24 horas con concentraciones crecientes de los mismos. El rango de concentración inicial se escogió en base a publicaciones previas relacionadas con otros inhibidores sintéticos de FABP4 (Furuhashi et al., 2007).

Para determinar el efecto de la estimulación celular sobre la viabilidad, triplicados de los cultivos se estimularon con 100 ng/mL de LPS durante las últimas 4 horas. La viabilidad celular se determinó en cada caso por citometría de flujo mediante el porcentaje de exclusión de yoduro de propidio añadido a una concentración final de 0,5 μ g/mL.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de viabilidad de la línea en presencia del compuesto de referencia PSA-3-49 junto con los porcentajes de viabilidad celular tras el cultivo con los 13 compuestos derivados del mismo en células estimuladas con LPS. Los resultados indican que la viabilidad de la línea THP-1 era buena en todos los casos. En cualquier caso a 25-50 μ M la mayoría de compuestos no resultaron tóxicos.

% Viabilidad de los cultivos				
Concentración	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
Compuesto				
PSA-3-49	91,8	92	92,6	91,3
PSA-3-31	94,8	72,5	94,6	94,12
PSA-3-59	89,30	93	96,20	96
PSA-3-58	83,90	67,5	88,3	94,5
PSA-3-62	N.D	N.D	97,8	97,72
PSA-3-61	N.D	N.D	100	94,28
PSA-3-63	N.D	N.D	100	95,55
PSA-3-64	96,87	96,79	96,48	96,56
PSA-3-65	95,93	95,9	96,39	95,66
PSA-3-66	N.D	N.D	96,15	95
PSA-3-75	N.D	N.D	97,9	97,6
PSA-5-64	92,77	91,53	92,42	N.D
PSA-5-70	92,33	81,22	18,78	N.D
PSA-6-6	91,76	93,33	91,05	N.D

Tabla 4: Porcentaje de Viabilidad de la línea celular THP-1 tratada con concentraciones

crecientes de los compuestos en presencia de LPS.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante citometría de flujo por exclusión de yoduro de propidio. N.D no determinado.

B) Efecto sobre la producción de TNF- α en la línea celular THP-1

Una vez descartada la toxicidad de los compuestos, se midió la concentración de TNF- α en el sobrenadante del cultivo celular de THP-1 pre-tratadas con los compuestos durante aproximadamente 24 horas sin estimular y estimuladas con LPS durante las 4 últimas horas de cultivo para inducir un estado inflamatorio. No se observó una inhibición de la producción de TNF- α estimulada con LPS en células THP-1 pre-tratadas con el compuesto de referencia PSA-3-49 ni se encontraron diferencias significativas tras el tratamiento con concentraciones crecientes del mismo (Figura 22).

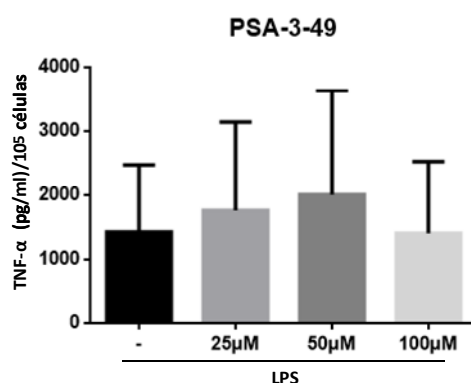


Figura 22: Evaluación de la producción de TNF- α en respuesta a LPS (100ng/ml, 4 horas) por células THP-1 pre-tratadas o no con concentraciones crecientes del compuesto PSA-3-49 durante 24 horas. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de la media (SEM) de 2 experimentos representativos.

En la Tabla 5, se resumen los resultados obtenidos con los 13 compuestos. Se seleccionaron 2 de ellos (PSA-3-64 y PSA-3-65) que inhibieron la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α de forma más eficaz y dependiente de dosis aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones y en ningún caso se alcanzó el 50% de inhibición (Figura 23).

Concentración de TNF- α (pg/mL)/10 ⁵ células						
Compuesto	N					
Concentración		-	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
PSA-3-49	2	1429 \pm 1481.6	N.D	1760 \pm 1950	2003 \pm 2302	1406 \pm 1584
PSA-3-58	3	6230 \pm 7716	N.D	5906 \pm 8437	5488 \pm 7512	4934 \pm 7578
PSA-3-31	2	3130 \pm 3887	N.D	4965 \pm 5485	5295 \pm 6086	2993 \pm 2994
PSA-3-59	2	3130 \pm 3888	N.D	4343 \pm 4893	3781 \pm 4185	3109 \pm 3425
PSA-3-75	1	14904	N.D	12806	13280	11029
PSA-3-62	2	12212 \pm 2936	N.D	10790 \pm 2526	10562 \pm 3616	7571 \pm 1515
PSA-5-64	3	6319 \pm 2715	5981 \pm 2991	6230 \pm 4068	4833 \pm 2739	N.D
PSA-5-70	3	6319 \pm 2715	5350 \pm 3552	3170 \pm 1888	3079 \pm 2358	N.D
PSA-6-6	3	6319 \pm 2715	6419 \pm 3402	7130 \pm 4198	6192 \pm 3335	N.D
PSA-3-65	5	10572 \pm 5472	8919 \pm 4917	9746 \pm 5078	6403 \pm 1558	5015 \pm 1958
PSA-3-63	3	10945 \pm 3984	N.D	8411 \pm 2390	7728 \pm 2017	7302 \pm 3037
PSA-3-64	7	10840 \pm 4952	10207 \pm 4323	9462 \pm 4146	6589 \pm 2006	6482 \pm 2728
PSA-3-61	2	10620 \pm 5188	N.D	9668 \pm 3003	10401 \pm 3053	8530 \pm 1517
PSA-3-66	1	8775	N.D	7257	7783	7489

Tabla 5: Concentración de TNF- α en el sobrenadante del cultivo de células THP-1 pretratadas con concentraciones crecientes de los compuestos de la familia PSA estimuladas con LPS (100ng/ml) durante 4 horas.

N: N° de experimentos realizados con cada compuesto

La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de N experimentos según el compuesto. N.D no determinado

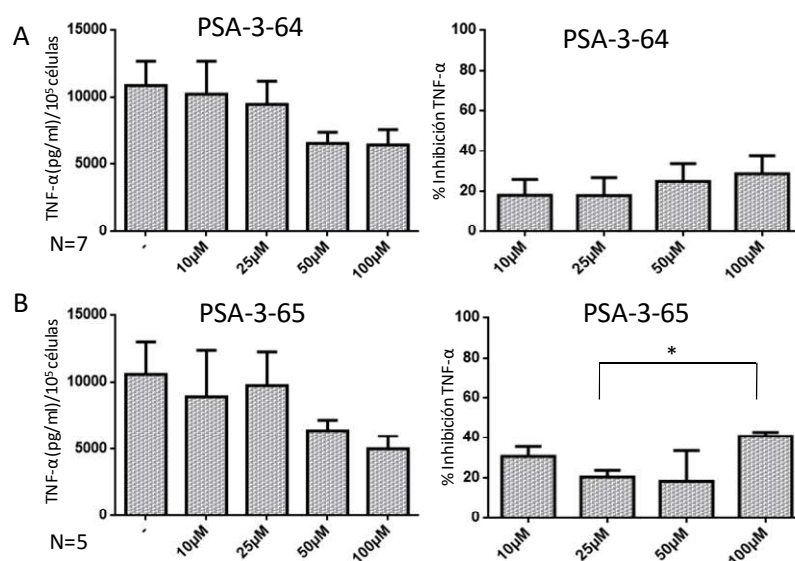


Figura 23: Evaluación de la producción de TNF- α y porcentaje de inhibición de la producción de TNF- α en respuesta a LPS (100ng/ml, 4 horas) por células THP-1 pre-tratadas o no con los compuestos PSA-3-64 (A) y PSA-3-65 (B) durante 24 horas. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 7 experimentos (PSA-3-64) y de 5 experimentos (PSA-3-65). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples).

La línea celular THP-1 es una línea pro-monocítica humana que expresa la proteína FABP4 a niveles bajos. Nos planteamos si la falta de efecto de los compuestos se podría deber a los bajos niveles de expresión y si en condiciones de mayor expresión de FABP4 podríamos obtener mejores resultados. Se ha descrito que el LPS, agonista principal de TLR4, es un potente inductor de la expresión de FABP4 en macrófagos de ratón (Makowski et al., 2001). Se estimularon las células THP-1 con PMA a una concentración final de 5ng/ml para inducir la diferenciación a monocitos maduros/macrófagos y explorar si en esas condiciones aumenta la expresión de FABP4 y si mejora el efecto anti-inflamatorio de los compuestos. La diferenciación se comprobó mediante citometría de flujo, verificando el aumento de expresión de marcadores específicos de monocitos/macrófagos como CD 14 y CD 11b (Figura 24).

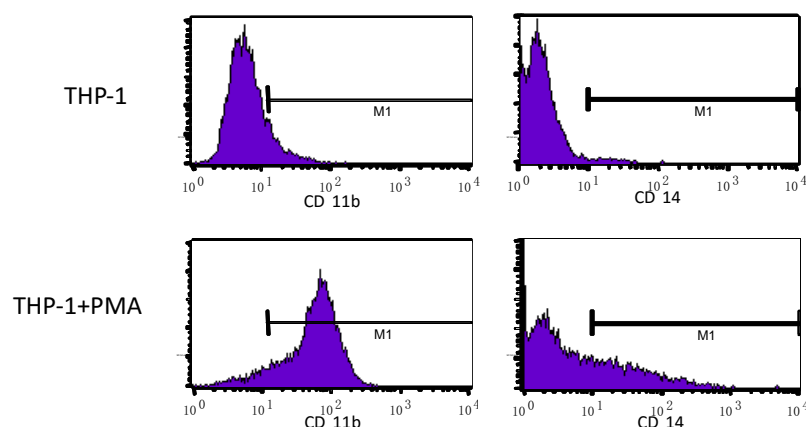


Figura 24: Expresión de CD14 y CD11b en células THP-1 estimuladas o no con PMA (5ng/ml) durante 72 horas.

Los niveles de expresión de FABP4 durante la diferenciación de THP-1 con PMA se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real. En la figura 25A se muestran los resultados obtenidos de un experimento representativo, apreciando un aumento transitorio de los niveles de expresión de FABP4 tras 24 horas de estimulación con PMA. Además estudiamos la cinética de expresión de FABP4 tras el tratamiento de la línea celular THP-1 con LPS a una concentración final de 100 ng/ml. Los resultados muestran un pequeño aumento de la expresión de FABP4 cuando se estimularon las células 1 hora con LPS (Figura 25B).

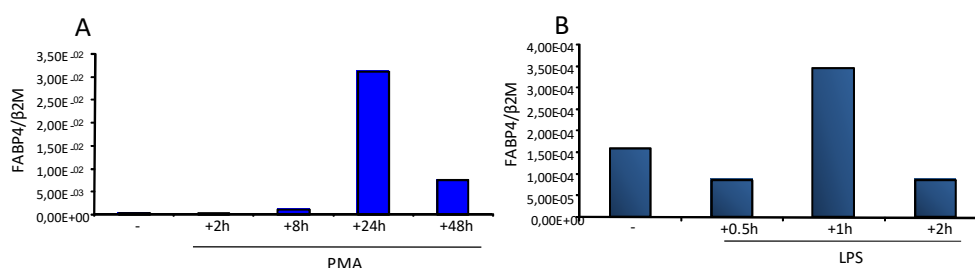


Figura 25: Cinética de la expresión de FABP4 en la línea celular THP-1 durante la estimulación A. PMA (5ng/ml) B. LPS (100ng/ml). Se muestra un experimento representativo de 2.

Seguidamente nos planteamos comprobar si el incremento de expresión de FABP4 al diferenciar la línea THP-1 con PMA se refleja en la regulación de la producción de TNF- α por los compuestos seleccionados.

No se encontraron diferencias significativas en la producción de TNF- α por la línea THP-1 en respuesta a LPS y pre-tratada con concentraciones crecientes del compuesto PSA-3-49 independientemente de si las células habían sido o no diferenciadas previamente con PMA; aunque la diferenciación previa incrementó la producción de TNF- α en respuesta a LPS (Figura

26). Tampoco obtuvimos diferencias significativas tras el pretratamiento con los compuestos PSA-3-64 o PSA-3-65 en células THP-1 diferenciadas con PMA (datos no mostrados).

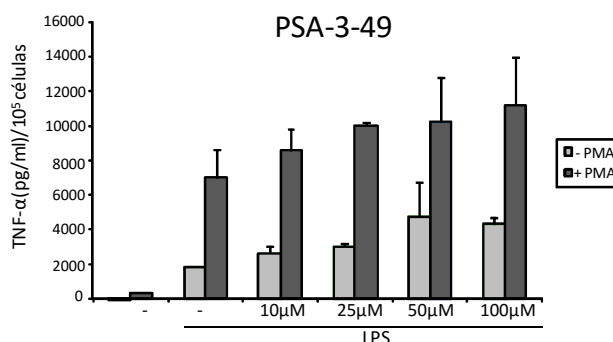


Figura 26: Evaluación de la producción de TNF- α en respuesta a LPS (100ng/ml, 4 horas) por células THP-1 diferenciadas o no con PMA (5 ng/ml) pre-tratadas con concentraciones crecientes del compuesto PSA-3-49. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de triplicados (n.s: test de Kruskal-Wallis seguido del test Dunn para comparaciones múltiples).

1.1.2 Efecto de los compuestos sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Seguidamente nos propusimos estudiar el efecto de los 2 compuestos seleccionados de la familia PSA (PSA-3-64 y PSA-3-65) en células primarias. En primer lugar estudiamos células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito, midiendo la concentración de TNF- α liberado al sobrenadante tras la estimulación con LPS.

A) Viabilidad celular

Primeramente analizamos la viabilidad celular de los cultivos tratados con los 2 compuestos seleccionados siguiendo el procedimiento antes descrito. La viabilidad celular fue mayor del 80% en presencia de los compuestos de la familia PSA (Figura 27).

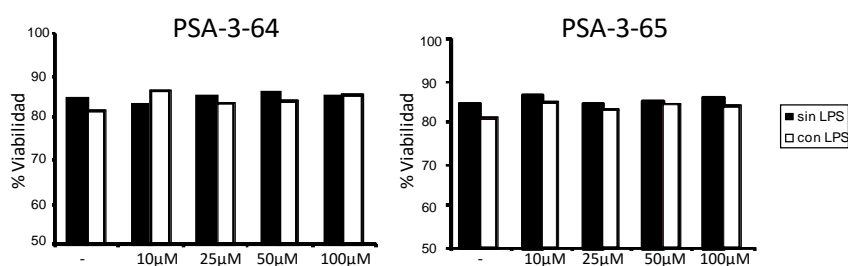


Figura 27: Porcentaje de Viabilidad de PBMCs de un donante sano preincubadas durante 24h con concentraciones crecientes de los compuestos seleccionados PSA-3-64 y PSA-3-65 estimuladas o no con LPS (10ng/ml).

B) Efecto sobre la producción de TNF- α

Los resultados muestran una inhibición de la secreción de TNF- α en PBMCs pre-tratados con los compuestos seleccionados aunque no de forma tan clara como en la línea celular, principalmente por la dispersión en los resultados debido a las diferencias en la respuesta que existen entre los distintos donantes (Figura 28). El porcentaje de inhibición de PSA-3-64 (25 μ M) es de $38,23 \pm 21,8$ % mientras que el del PSA-3-65 (25 μ M) es de $13,65 \pm 53,64$ %.

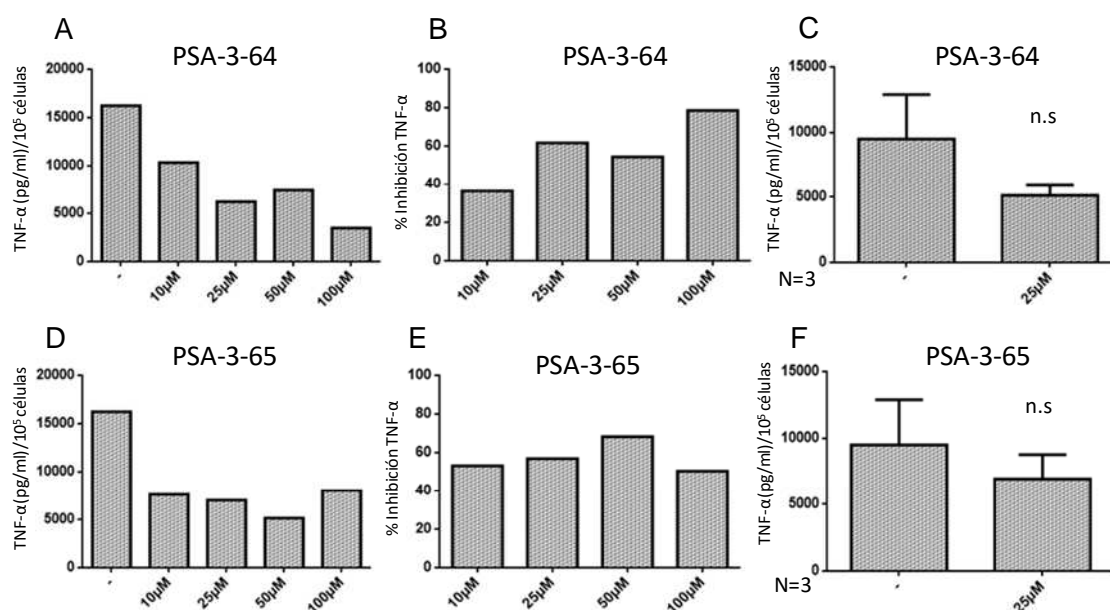


Figura 28: Evaluación de la producción de TNF- α y porcentaje de inhibición de TNF- α en respuesta a LPS (10ng/ml, 4 horas) por células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos pre-tratadas o no con los compuestos PSA-3-64 (A,B,C) y PSA-3-65 (D,E,F) durante 24 horas. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 1 (A,B,D,E) o 3 experimentos (C,F) (n.s: test de Wilcoxon).

1.1.3 Respuesta en Monocitos aislados de individuos sanos

Dado que las PBMCs son poblaciones complejas constituidas por distintos tipos celulares que pueden estar representados en diferentes proporciones según el donante, nos propusimos estudiar el efecto de los compuestos en poblaciones más homogéneas. Aislamos para ello monocitos CD14+ de sangre periférica de individuos sanos.

A) Viabilidad celular y efecto sobre la producción de TNF- α

Los monocitos CD14+ se purificaron utilizando microesferas magnéticas asociadas a anticuerpos anti-CD14 humano comprobando mediante citometría que la pureza era mayor o igual al 90%.

Como en las poblaciones anteriores analizamos la viabilidad celular, comprobando que esta no resultaba modificada en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos (Figura 29).

El pre-tratamiento con los compuestos seleccionados causó una pequeña inhibición de la producción de TNF- α en monocitos estimulados con LPS a bajas dosis de los compuestos aunque nunca se alcanzó el 50% de inhibición y el resultado global no resultó estadísticamente significativo (Figura 30 y 31).

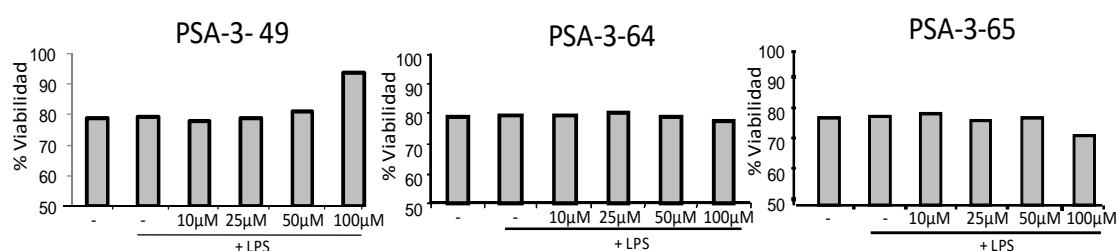


Figura 29: Porcentaje de Viabilidad de Monocitos aislados de un donante sano preincubados durante 24h con concentraciones crecientes de los diferentes compuestos estimulados o no con LPS (10ng/ml).

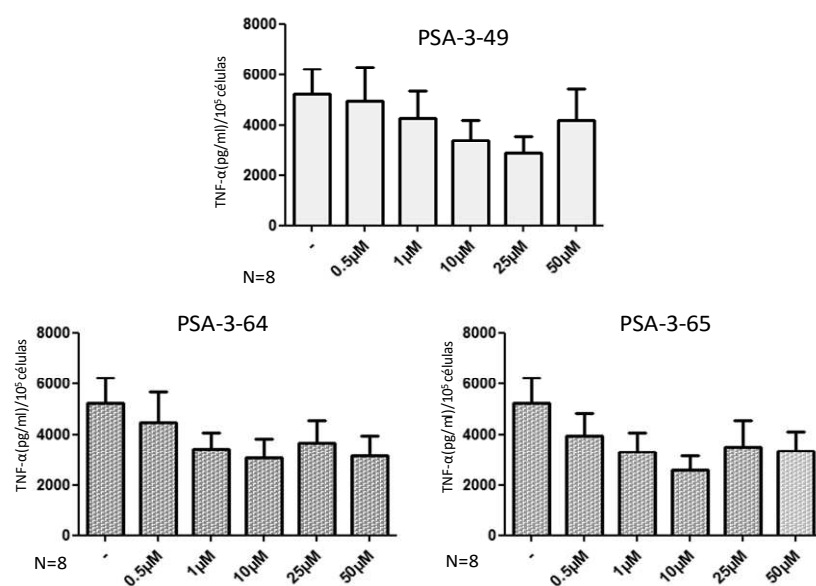


Figura 30: Evaluación de la producción de TNF- α en respuesta a LPS (10ng/ml, 4 horas) por monocitos aislados de donantes sanos pre-tratados o no con los compuestos PSA-3-64, PSA-3-65 y PSA-3-49 durante 24 horas. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 8 experimentos (n.s.:Kruskal-Wallis).

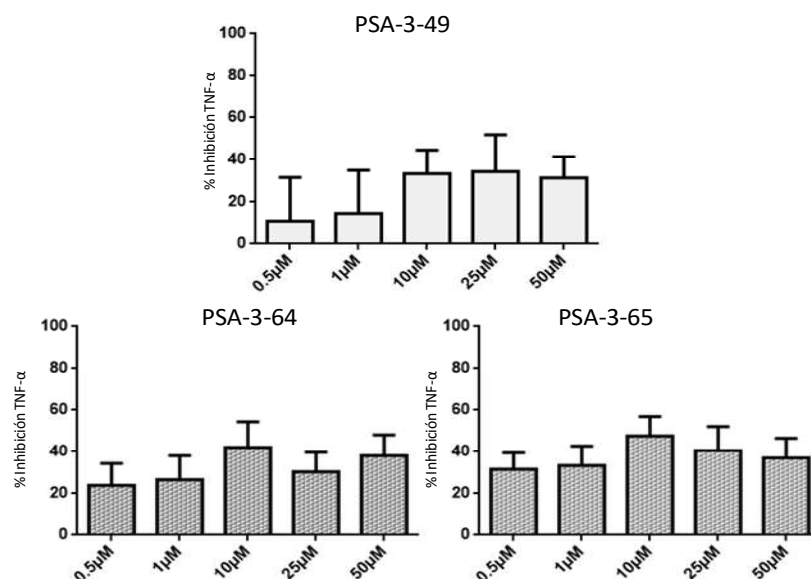


Figura 31: Porcentaje de inhibición de la producción de TNF- α en respuesta a LPS (10ng/ml, 4 horas) por monocitos aislados de donantes sanos pre-tratados o no con los compuestos PSA-3-64, PSA-3-65 y PSA-3-49 durante 24 horas. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 8 experimentos (n.s.:Kruskal-Wallis).

1.2 Análisis del efecto de 22 compuestos sintéticos (Familia EMB) derivados de sales de Bencimidazol (EMB-9) e indolinio(EMB-12) sobre la producción deTNF- α

Se estudió otra familia de compuestos que conservan la estructura madre del compuesto de referencia (PSA-3-49), añadiendo anillos benzídicos (Familia EMB-9 y EMB-12). Esta familia se dividió en dos sub-familias:

-Seis compuestos derivados de EMB-9 (sal derivada de acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-*b*]bencimidazolio).

-Catorce compuestos derivados de EMB-12 (sal derivada de piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indolinio).

1.2.1 Respuesta de la línea celular THP-1

A) Viabilidad celular

Como en el apartado anterior, se estudió tanto la viabilidad celular (Tabla 6) como la concentración de TNF- α en el sobrenadante celular del cultivo de THP-1 estimulada con LPS y pre-tratada con los distintos compuestos a concentraciones crecientes (Tabla 7).

% Viabilidad de los cultivos				
Concentración	10µM	25µM	50µM	100µM
Compuesto				
EMB-9	86	79	84	91
EBM-007	9,76	0,08	0	0
EBM-008	69,91	80,46	86	66
EBM-T35b	51	54	0	0
EBM-71h	12	2	0	0
EBM-455	25,28	22	19	6
EBM-917	0	0	0	0
EBM-51	9,54	1,6	0	0
EMB-12	93	88	88	84
EBM-002	0	0	0	0
EBM-T9	5,74	0	0	0
EBM-011	63,28	5	1	0
EBM-23	0	0	0	0
EBM-24	0	0	0	0
EBM-T59	89,72	37	4	8
EBM-T60	0,9	0	0	0
EBM-82a	42	4	0	0
EBM-T76h	33,05	7	0	0
EBM T78d	61,27	9	1,5	0
EBM-82b	76,36	73	65	54
EBM-82c	3,76	0	0	0
EBM-83b	65,02	0	0	0

Tabla 6: Porcentaje de viabilidad de la línea celular THP-1 tratada con concentraciones crecientes de los compuestos en presencia de LPS.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante citometría de flujo por exclusión de yoduro de propidio. N.D no determinado.

Concentración de TNF- α (pg/mL)									
Concentración		Control	0.1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
Compuestos	N								
EMB-9	6	12063 \pm 3839				9751 \pm 3637	6373 \pm 1811	3586 \pm 1735	1798 \pm 1842
EBM-007	1	6443				4117	5265		
EBM-008	3	5386 \pm 1829		4862	4719	5001 \pm 949	2954 \pm 2542	864	
EBM-T35b	1	4921				0			
EBM-71h	1	4921				0			
EBM-455	2	4097 \pm 1163		5614	4381	2479 \pm 321	557 \pm 787		
EBM-917	1	4921				866			
EBM-51	2	16693				11086	1589		
EMB-12	5	14148 \pm 5598				8012 \pm 4439	10517 \pm 4214	8188 \pm 3561	7004 \pm 2144
EBM-002	1	7265				950			
EBM-T9	1	7265				1713			
EBM-011	2	5270 \pm 2821		4394	3374	1493 \pm 357	1084 \pm 1533		
EBM-23	1	7265				955			
EBM-24	1	16693				937			
EBM-T59	3	12220 \pm 7747		6011	3975	6713 \pm 3067	766 \pm 1084		
EBM-T60	1	16693				NV			
EBM-82a	1	17150				17779			
EBM-T76h	1	17150				951			
EBM T78d	9	7421 \pm 4096	6483 \pm 1959	3885 \pm 2059	1905 \pm 1191	847 \pm 508	0		
EBM-82b	2	10212 \pm 9811		5750	4497	7210 \pm 1917	5373 \pm 359		
EBM-82c	1	8431				892			
EBM-83b	1	8431				968			

Tabla 7: Concentración de TNF- α en el sobrenadante del cultivo de células THP-1 pre-tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos de la familia EMBy estimuladas con LPS (100ng/ml) durante 4 horas.

N: Nº de experimentos realizados con cada compuesto. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de N experimentos según el compuesto. N.D no determinado

El tratamiento con LPS no afectó a la viabilidad celular de los cultivos como se muestra en la Figura 32.

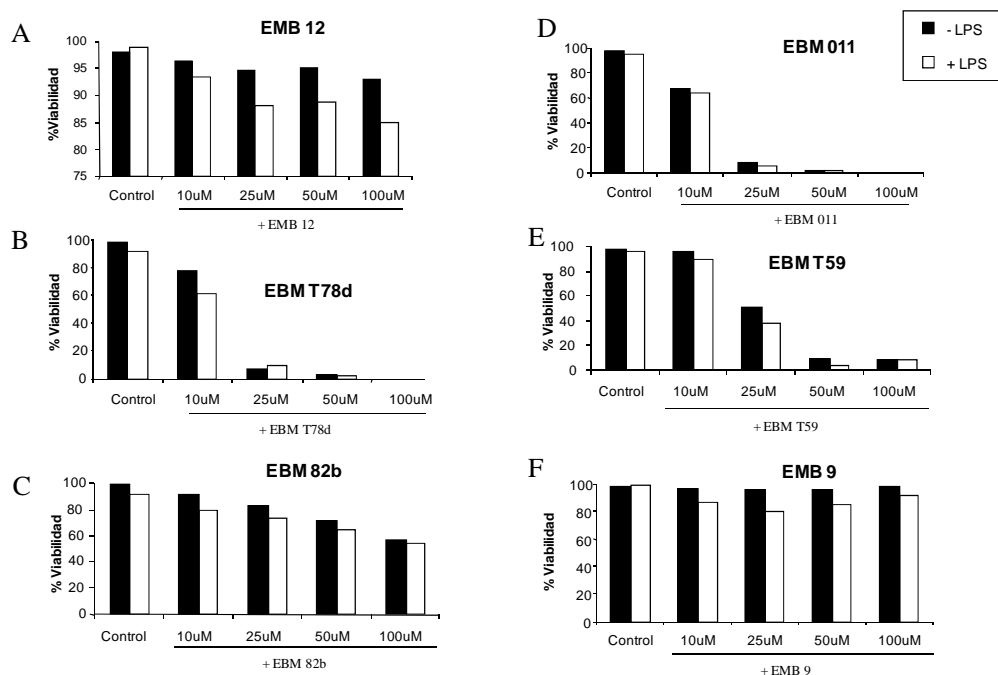


Figura 32: Porcentaje de viabilidad de células THP-1 preincubadas durante 24h con los compuestos seleccionados a distintas concentraciones y estimuladas o no con LPS (100ng/ml).

B) Producción de TNF- α

Como se muestra en el apartado anterior, algunos compuestos resultaron tóxicos a las concentraciones más altas. Decidimos por tanto, disminuir las concentraciones de los compuestos más tóxicos en el bioensayo de producción de TNF- α .

En una primera fase seleccionamos los compuestos EMB-9, EBM 82b y EMB-12 ya que no afectaron a la viabilidad celular en el rango de concentraciones de 10µM-100µM e inhibieron la producción de TNF- α en la línea THP-1; aunque los compuestos EBM T78d, EBM T59 y EBM 011 mostraron una mayor capacidad de inhibición pero también toxicidad a concentraciones superiores a 10µM (Figura 32 y 33).

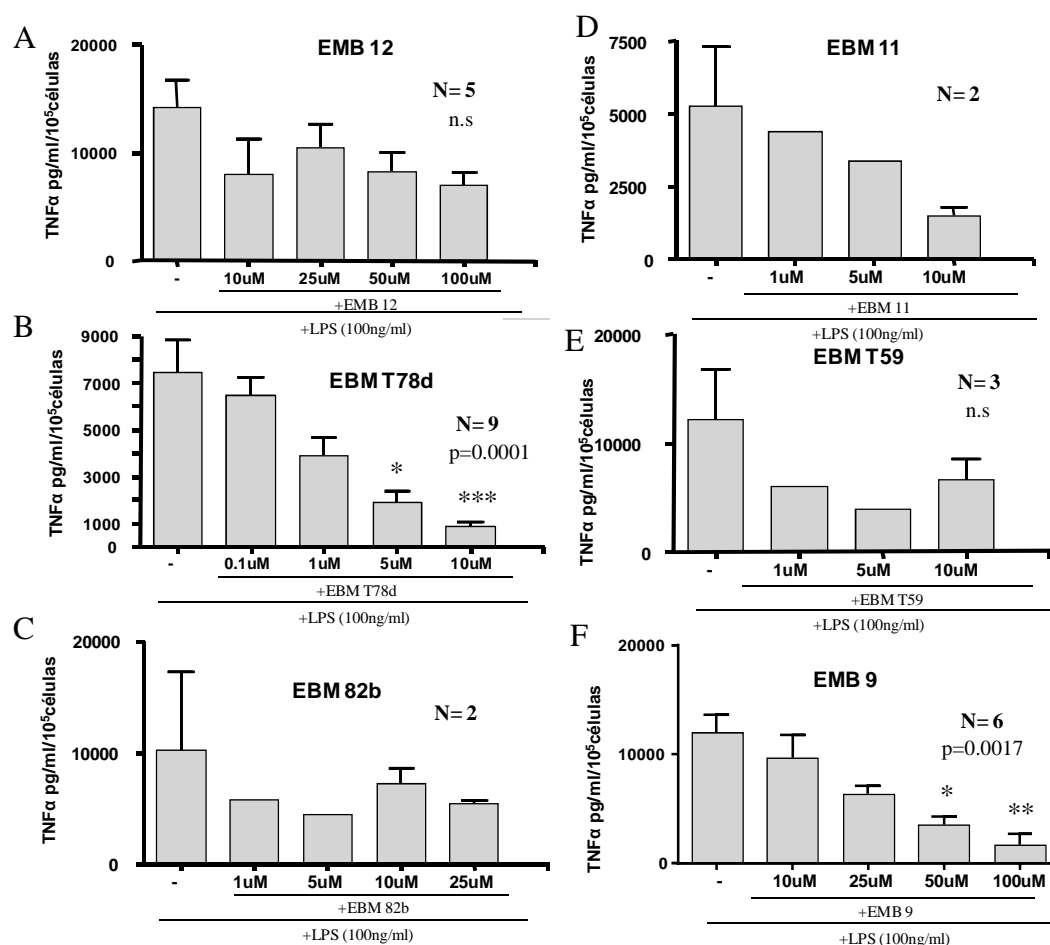


Figura 33: Evaluación de la producción de TNF- α en respuesta a LPS (100ng/ml, 4 horas) por células THP-1 pre-tratadas o no con los compuestos durante 24 horas. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 5 experimentos (EMB 12)(A), 9 experimentos (EBM T78d)(B), 2 experimentos (EBM 82b) (C), 2 experimentos (EBM 11)(D), 3 experimentos (EBM T59)(E) y 6 experimentos (EMB 9)(F). n.s = no significativo.* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ (test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples).

Se calculó el porcentaje de inhibición de la producción de TNF- α (Tabla 8) por los distintos compuestos y se seleccionó el compuesto EBM T78d ya que el pre-tratamiento con el mismo originó una inhibición estadísticamente significativa de la producción de TNF- α dependiente de dosis con la IC₅₀ más baja de todos los compuestos estudiados.

% Inhibición de la producción TNF-α								IC ₅₀ (μM)
Concentración	0.1μM	1μM	5μM	10μM	25μM	50μM	100μM	
Compuestos								
EBM-82c				89				
EBM-82b		44	56	29	47			
EMB-83b				88				
EBM-T76h				94				
EBMT78d	-0,97	34,9	63,4	87,8				4,49
EBM-T9				76				
EBM-T59		51	67	45	94			11,5
EBM-11		11	36	72	79			9,88
EMB-12				38	29	35	40	
EBM-24				94				
EBM-23				87				
EBM-51				34	90			
EBM-8	9	12	7	45	84			14,6
EMB-9				19	47	70	85	39,2
EBM-455			7	39	86			

Tabla 8: Porcentaje de Inhibición de células THP-1 preincubadas durante 24h con los compuestos a dosis crecientes y estimuladas con LPS (100ng/ml) durante 4 horas. IC₅₀ de los compuestos seleccionados.

IC₅₀ Dosis inhibidora al 50% Los datos se muestran como el valor según el compuesto.

1.3 Expresión de la proteína de fusión EGFP-FABP4

Como se había descrito que ligandos de PPAR- γ (troglitazona) inducen la translocación al núcleo de FABP4 (Tan et al., 2002) nos planteamos generar una proteína de fusión para analizar si nuestros ligandos tendrían el mismo efecto.

Para ello, realizamos una construcción para expresar una proteína de fusión con proteína verde fluorescente (pGFP-FABP4). Los primers utilizados para la PCR abarcaban todo el marco de lectura de FABP4 que se verificó mediante secuenciación. Analizamos la expresión del ARNm en las líneas celulares COS-7 y HEK 293 transfectadas con el plásmido pGFP-FABP4 (Figura 34) y vimos que aumentaba la expresión de mRNA de FABP4 en las dos líneas celulares transfectadas con la proteína de fusión GFP-FABP4.

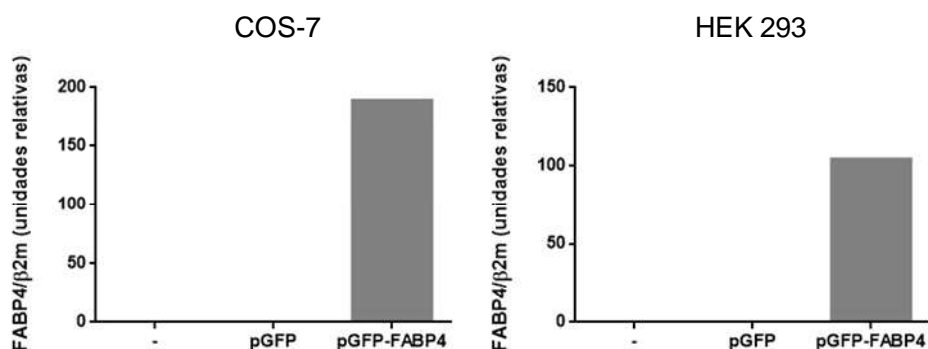


Figura 34: Expresión del mRNA de FABP4 en las líneas celulares COS-7 y HEK 293 transfectadas con la proteína de fusión GFP-FABP4. Los resultados se expresan como unidades relativas tras la normalización de las moléculas de mRNA de FABP4 en relación con el número de moléculas de mRNA de β2 microglobulina detectadas en las mismas muestras de un experimento representativo.

En un siguiente experimento transfectamos la línea celular COS-7 con la construcción p-EGFP-FABP4 y comprobamos la expresión de la proteína de fusión mediante western blot (Figura 35).

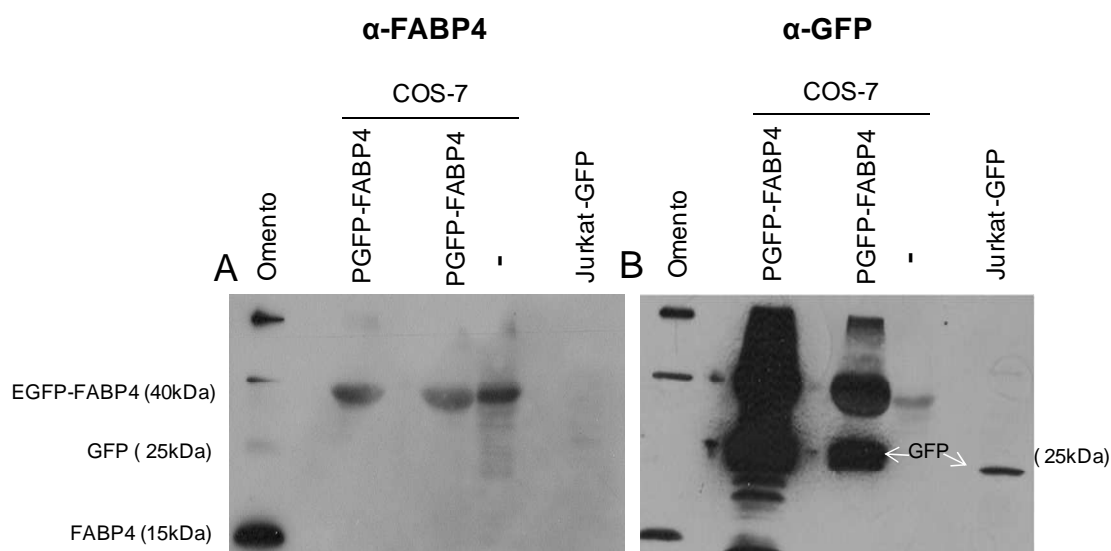


Figura 35: Western blot representativo de células COS-7 y Jurkat transfectadas o no con el plásmido pGFP-FABP4. La expresión de FABP4 (A) y GFP (B) se detectó mediante SDS-PAGE e transferencia e incubación con los anticuerpos monoclonales anti-GFP o anti-FABP4.

Para explorar la localización subcelular de FABP4, transfectamos la línea celular COS-7 y analizamos la expresión de GFP transcurridas 48 horas mediante microscopía de fluorescencia, comprobando la localización de FABP4 en el citoplasma celular (Figura 36). Se verificó la eficacia de transfección midiendo la fluorescencia en un citómetro de flujo siendo la frecuencia de células transfectadas menor del 1%.

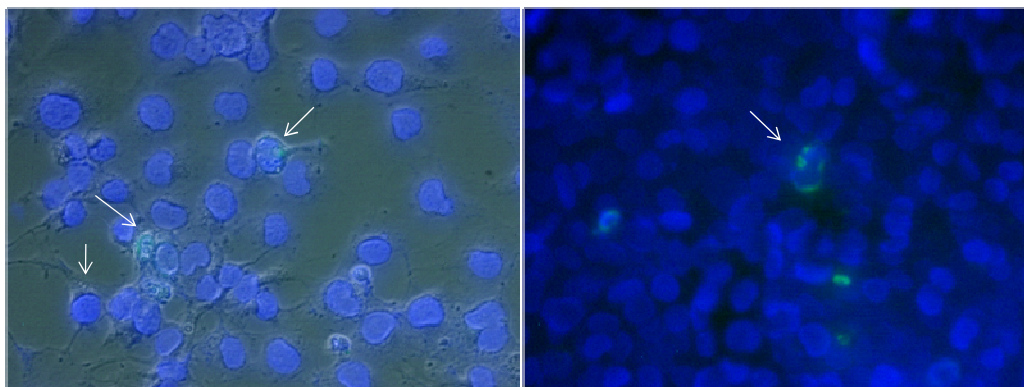


Figura 36: Detección de la proteína FABP4 en células COS-7. Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente con el plásmido pGFP-FABP4. Posteriormente se fijaron y se tiñeron los núcleos con Hoechst y las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes son representativas de un experimento independiente.

Además transfectamos células mesenquimales de tejido adiposo mediante nucleofección y se analizó a las 48 horas la expresión de GFP mediante microscopía de fluorescencia. Como podemos comprobar en la Figura 37, los niveles de expresión fueron muy bajos; aunque parece que pudiera localizarse en citoplasma y núcleo.

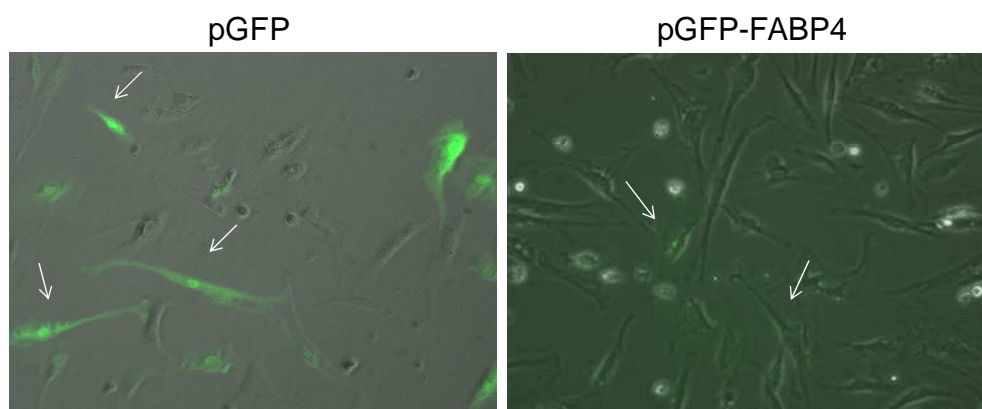


Figura 37: Detección de la proteína GFP y GFP-FABP4 en células mesenquimales de tejido adiposo. Las células mesenquimales se transfectaron mediante nucleofección con los plásmidos GFP y GFP-FABP4. Tras 48 horas se verificó la eficacia de transfección midiendo la fluorescencia en un citómetro de flujo. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes son representativas de un experimento independiente.

Desestimamos este abordaje debido a la baja eficacia de transfección de la construcción.

1.4 Ensayos de unión a FABP4

Con objeto de verificar si los efectos sobre la producción de $\text{TNF-}\alpha$ pudieran deberse a un efecto directo de los compuestos sobre la proteína FABP4, se realizaron ensayos de unión utilizando proteína recombinante y un ligando sintético fluorescente en un ensayo de desplazamiento de fluorescencia.

Se estudiaron en este ensayo los compuestos seleccionados anteriormente (PSA-3-49, PSA-3-64, PSA-3-65 y EBM T78d) y nueve compuestos adicionales de las familias EMB (ver material y métodos).

Se realizaron ensayos de fluorescencia que nos permitieron identificar ligandos de FABP4 de una forma simple, reproducible y con alta sensibilidad. Un buen ligando (y/o inhibidor) de FABP4 redujo la fluorescencia al desplazar el reactivo de detección como ocurre con el ácido araquidónico (ligando conocido de FABP4 con una IC_{50} de $3\mu M$). Como control de nuestros ensayos utilizamos otro ligando conocido de FABP4 como es el ácido oleico que mostró una $IC_{50} = 2,165\mu M$ (Figura 38).

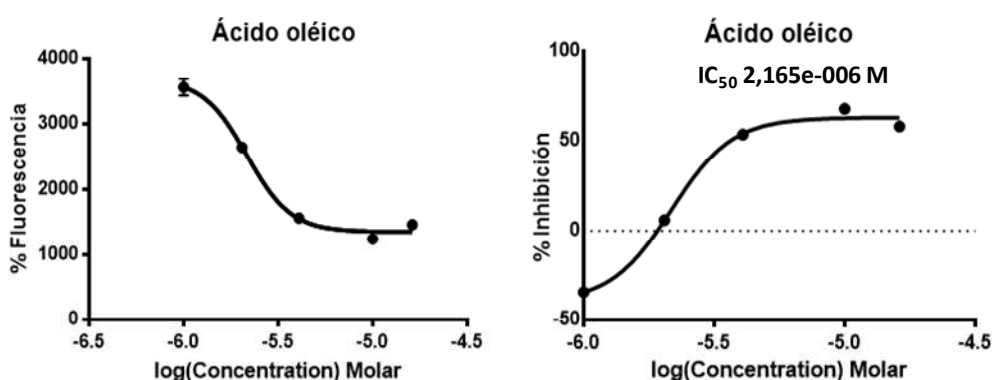


Figura 38: Curva de inhibición del ácido oleico. Se analizaron las medias de triplicados y se interpolaron los resultados en una curva estándar utilizando la regresión no lineal y el modelo log (inhibidor) frente a respuesta (variable slope) para estudiar la IC_{50} (concentración inhibitoria máxima media) del ligando.

Nueve compuestos analizados de la familia PSA desarrollados a partir de la estructura del compuesto de referencia PSA-3-49 fueron desestimados por presentar auto-fluorescencia basal. Los únicos compuestos en los que se pudo originar una curva de desplazamiento de fluorescencia a distintas concentraciones fueron PSA-3-49, PSA-3-65 y EBM T78d siendo PSA-3-49 el mejor ligando de FABP4 (Figura 39) como estaba descrito anteriormente (Lehmann et al., 2004).

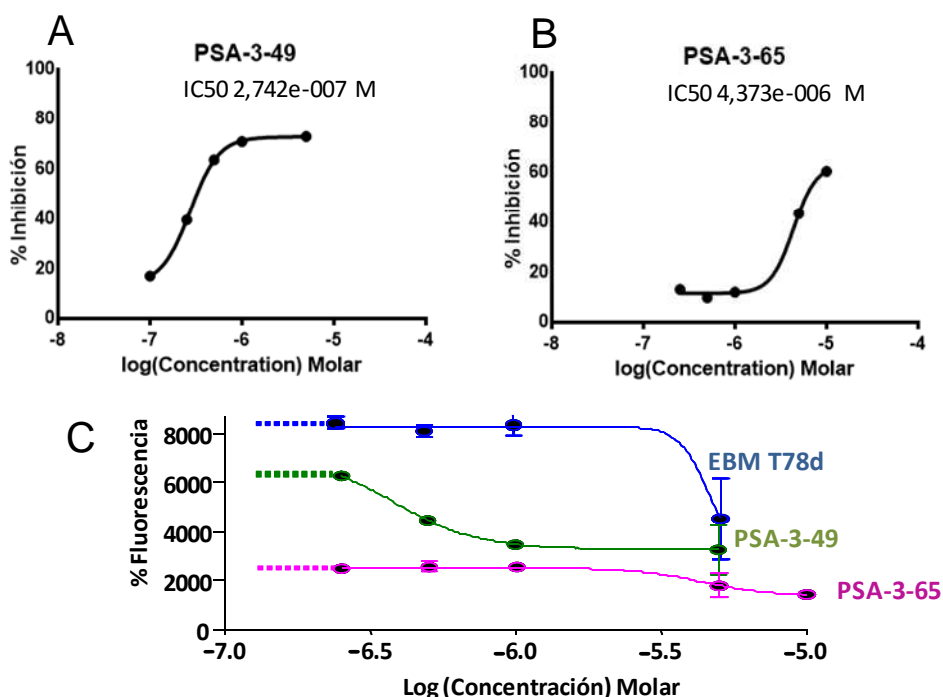


Figura 39: Curva de inhibición de PSA-3-49 (A), Curva de inhibición de PSA-3-65 (B). Se analizaron las medias de triplicados y se interpolaron los resultados en una curva estándar utilizando la regresión no lineal y el modelo log (inhibidor) frente a respuesta (variable slope) para estudiar la IC₅₀ (concentración inhibitoria máxima media) de cada inhibidor. Curva de desplazamiento de la fluorescencia de los diferentes compuestos (PSA-3-49, PSA-3-65 y EBM T78d) para la identificación de ligandos de FABP4 (C).

Los resultados indican que tal y como se había descrito previamente la molécula PSA-3-49 (IC₅₀ = 0,274 μM) es un buen ligando de FABP4 con una afinidad superior a la de los ácidos grasos oleico o araquidónico. Sin embargo PSA-3-65, aunque podría actuar como ligando de FABP4 mostró una afinidad por la proteína similar o algo inferior a la de los ácidos grasos por lo que no sería un buen competidor. No pudimos ensayar concentraciones superiores de T78d porque aumentaba su auto-fluorescencia basal por lo que nos fue imposible calcular una IC₅₀ para este compuesto.

2. Análisis del efecto de los compuestos PSA-3-49, PSA-3-64 y PSA-3-65 (FAMILIA PSA)

Como muestran los resultados anteriores en el ensayo de unión, el compuesto PSA-3-49 resultó ser un buen ligando de FABP4 pero no disminuyó la producción de TNF-α tan eficazmente como el compuesto EBM T78d. Quisimos analizar con mayor profundidad los efectos a nivel funcional tanto del compuesto de referencia PSA-3-49 como el de los dos compuestos desarrollados a partir de él (PSA-3-64 y PSA-3-65).

2.1 Efectos de los compuestos de la familia PSA sobre la producción de otras citoquinas en distintos tipos celulares

A) Monocitos humanos aislados de sangre periférica estimulados con LPS (10ng/ml) durante 4h

Se analizó el efecto de los compuestos PSA-3-49, PSA-3-64 y PSA-3-65 sobre la producción de IL-6 en monocitos primarios CD14+ estimulados con LPS (10ng/ml) durante 4 horas. La producción de IL-6 en respuesta a LPS se inhibió tras el pre-tratamiento con el compuesto PSA-3-49 y PSA-3-65 aunque no de forma dependiente de dosis (Figura 40). El tratamiento con el compuesto PSA-3-64 no inhibió la producción de IL-6 (datos no mostrados).

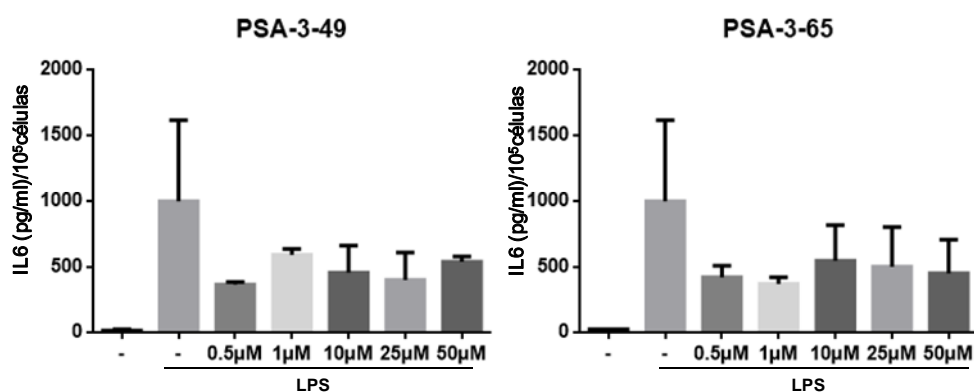


Figura 40: Evaluación de la producción de IL-6 en respuesta a LPS (10ng/ml, 4 horas) por monocitos aislados de donantes sanos pre-tratados o no con los compuestos, PSA-3-65 y PSA-3-49 durante 24 horas. La concentración de IL-6 en el sobrenadante celular se evaluó mediante CBA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 2 experimentos.

B) Células madre mesenquimales de tejido adiposo estimulados con LPS (50ng/ml) durante 24 horas

El pre-tratamiento con los compuestos de la familia PSA no inhibió la producción de IL-6 en células madre mesenquimales a excepción de una pequeña inhibición tras el tratamiento con el compuesto de referencia PSA-3-49 (Figura 41). En el caso de los adipocitos tampoco se inhibió la producción de IL-6 o MCP-1 tras el pre-tratamiento con los compuestos de la familia PSA (datos no mostrados).

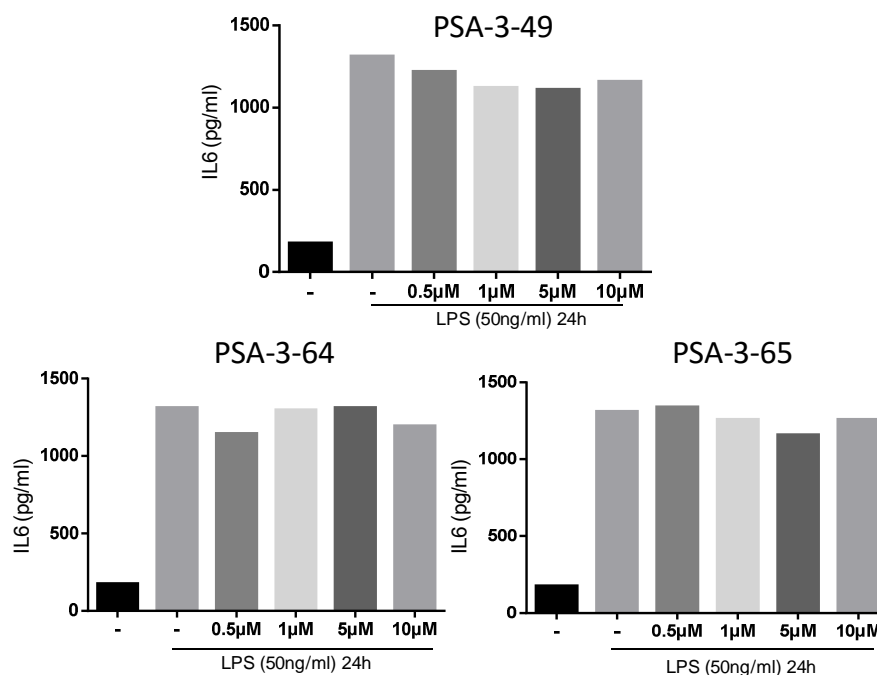


Figura 41: Producción de la citoquina IL-6 en células madre mesenquimales tratadas con los compuestos PSA-3-49, PSA-3-64 y PSA-3-65 durante 24 horas y posteriormente estimuladas con LPS (50ng/ml) 24 horas. La concentración de IL-6 en el sobrenadante celular se evaluó mediante CBA. Los datos muestran el valor de un experimento.

2.2. Modulación de la expresión génica de la citoquina IL-6 por el compuesto PSA-3-49

Se llevaron a cabo estudios de RT-PCR a tiempo real para explorar si el compuesto PSA-3-49 era capaz de inhibir la expresión de la citoquina IL-6 a nivel transcripcional en células madre mesenquimales.

A) Preadipocitos

Las células madre mesenquimales (pre-adipocitos) se trataron con concentraciones crecientes del compuesto PSA-3-49 durante 24 horas y posteriormente se estimularon durante 24 horas con 50 ng/ml de LPS.

El pretratamiento con el compuesto PSA-3-49 no inhibió la expresión de IL-6 en células mesenquimales (Figura 42).

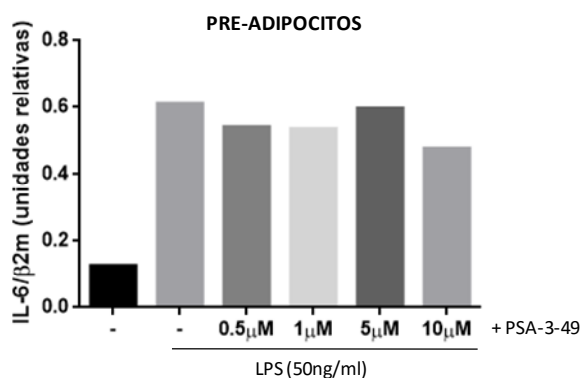


Figura 42: Expresión de IL-6 en células madre mesenquimales tras el tratamiento con el compuesto PSA-3-49 a distintas dosis durante 24 horas y la estimulación con LPS (50ng/ml) durante 24 horas. Los valores se muestran como unidades relativas tras la normalización frente al mRNA de β2 microglobulina cuantificado en la mismas muestras de un experimento representativo.

2.3 Regulación de rutas metabólicas por PSA-3-49

Un trabajo de Cao y colaboradores sugiere que las concentraciones plasmáticas de FABP4/aP2 podrían regular el metabolismo de la glucosa en el hígado. La neutralización o inhibición de la secreción de FABP4 reduciría la producción de glucosa y mejoraría el fenotipo diabético de ratones obesos por lo que sería una buena estrategia terapéutica eficaz para la diabetes (Cao et al., 2013).

Quisimos analizar si el compuesto PSA-3-49 al ser un ligando de FABP4, podría modular la función de FABP4 soluble.

Utilizamos explantes de tejido adiposo humano (subcutáneo o omento) estimulados con IBMx como fuente de FABP4 soluble (Cao et al., 2013).

Cultivamos explantes de omento de individuos obesos con los compuestos PSA-3-49 y PSA-3-65 a 5 μM y 10 μM respectivamente durante 18 horas tras las cuales se estimularon los cultivos con IBMx (1mM) durante 3 horas (Figura 43 A). Se utilizó una concentración más alta de PSA-3-65 ya que su IC₅₀ es superior a la del compuesto PSA-3-49. La liberación al medio de FABP4 soluble se evaluó mediante *western blot* (Figura 43 B) y se midió la concentración de FABP4 mediante la técnica de ELISA (Figura 43 C).

Los resultados muestran que la liberación de FABP4 aumentó tras la estimulación con IBMx, como se había descrito previamente (Cao et al., 2013) y el pre-tratamiento con el compuesto PSA-3-49 disminuyó la liberación hasta niveles basales. Sin embargo el compuesto PSA-3-65 no tuvo ningún efecto (Figura 43).

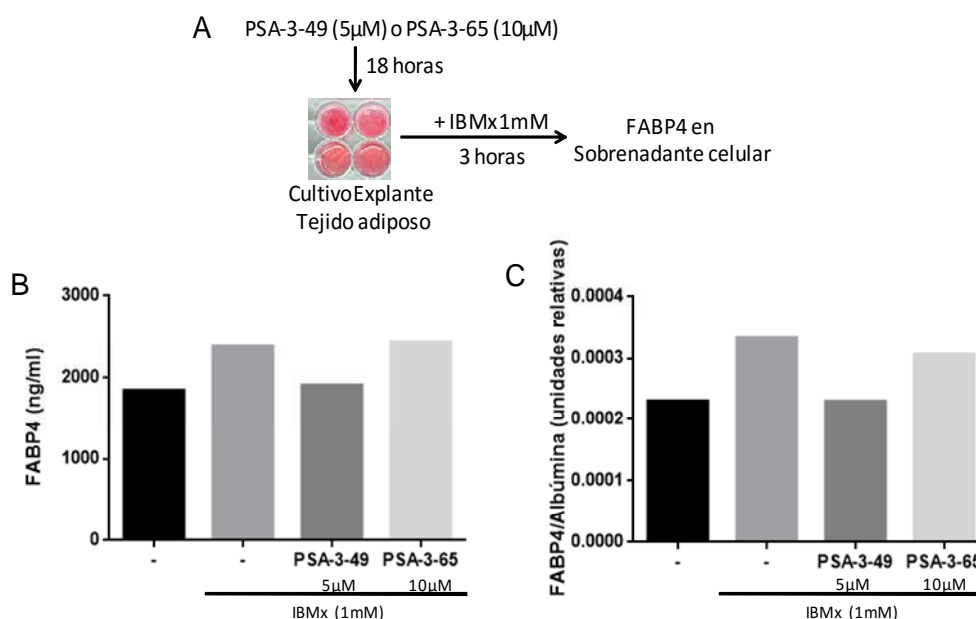


Figura 43: Análisis del efecto de los compuestos PSA-3-49 y PSA-3-65 sobre la secreción de FABP4 en tejido adiposo. Se cultivaron explantes de omento procedente de un individuo obeso en presencia de los compuestos PSA-3-49 y PSA-3-65 durante 18 horas. Posteriormente se estimularon los cultivos con IBMx (1mM) durante 3 horas (A). La liberación al medio de FABP4 se analizó mediante ELISA (B) y western blot (C).

Una de las causas del aumento de glucosa circulante en DM2 es el aumento de producción de glucosa por el hígado.

Se ha descrito que FABP4 soluble podría tener efectos sobre el metabolismo hepático aumentando la producción de glucosa. Se ha propuesto que la neutralización de FABP4 soluble podría representar una estrategia terapéutica frente a la diabetes (Cao et al., 2013). El siguiente objetivo que nos propusimos fue analizar si FABP4 soluble podría tener un efecto sobre la sensibilidad a la insulina en hepatocitos humanos y si el compuesto PSA-3-49 podría modificar este efecto. Para ello analizamos si FABP4 soluble producida por adipocitos podría regular la fosforilación de AKT inducida por insulina.

En un siguiente experimento utilizamos medio condicionado (MC) procedente de explantes de tejido adiposo subcutáneo de individuos no obesos cultivados al 0,5% FBS. La liberación de FABP4 al medio se evaluó mediante WB (datos no mostrados). Células Hepa (línea celular de hepatocitos humanos) se cultivaron en MC al 50% en 0,5% FBS durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se estimularon con insulina (2,5 μ g/ml) en presencia o ausencia del compuesto PSA-3-49 a distintas concentraciones (1, 5 y 10 μ M) durante 1 hora. Como vemos en la Figura 44 el MC de adipocitos aumentó la fosforilación de AKT. El tratamiento con el compuesto PSA-3-49 disminuyó la fosforilación de AKT de forma dependiente de dosis.

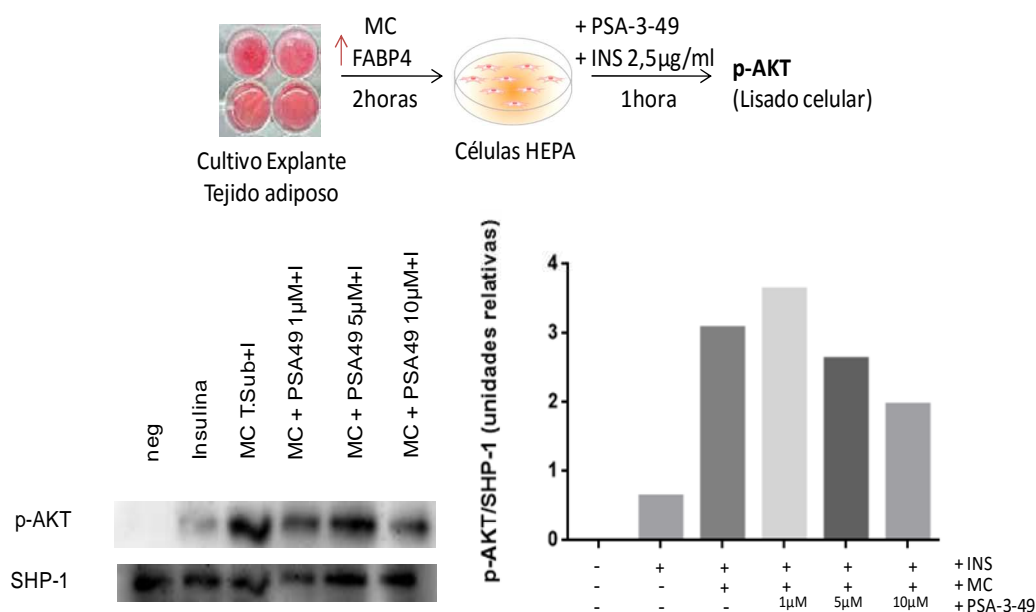


Figura 44: Análisis mediante western blot del efecto del compuesto PSA-3-49 sobre la fosforilación de AKT en células Hepa cultivadas con medio condicionado procedente de explantes de tejido subcutáneo humano durante 2 horas, estimuladas con insulina (2,5µg/ml) y tratadas con el compuesto PSA-3-49 a distintas concentraciones durante 1 hora. La gráfica muestra los valores densitométricos de p-AKT normalizados con relación a la proteína SHP-1 de lisados celulares de un experimento representativo.

Como fuente alternativa de FABP4 soluble, preparamos medio condicionado de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos (ver material y métodos). Después de la diferenciación, se mantuvieron las células durante 2 días con 0,5 % FBS y se recogieron los sobrenadantes de cultivo de los adipocitos diferenciados (MC 3T3-L1). La concentración de FABP4 en el sobrenadante de los adipocitos diferenciados se evaluó mediante ELISA (4,183 ng/ml en SN de adipocitos diferenciados versus 0,877 ng/ml en células sin diferenciar).

Las células Hepa se cultivaron con MC 3T3-L1 durante 2 horas y posteriormente se trataron con insulina (2,5µg/ml) y con el compuesto PSA-3-49 a distintas concentraciones (5 y 10µM) durante 1 hora.

Igual que ocurrió en el experimento anterior, en presencia del sobrenadante de los adipocitos diferenciados rico en FABP4 aumentó la fosforilación de AKT en respuesta a la insulina mientras que el tratamiento con el compuesto PSA-3-49 disminuyó el incremento de la fosforilación de AKT inducida por el MC de forma dosis dependiente (Figura 45). En paralelo medimos el porcentaje de viabilidad celular mediante citometría de flujo por exclusión de yoduro de propidio (PI) que resultó ser alta en todos los casos.

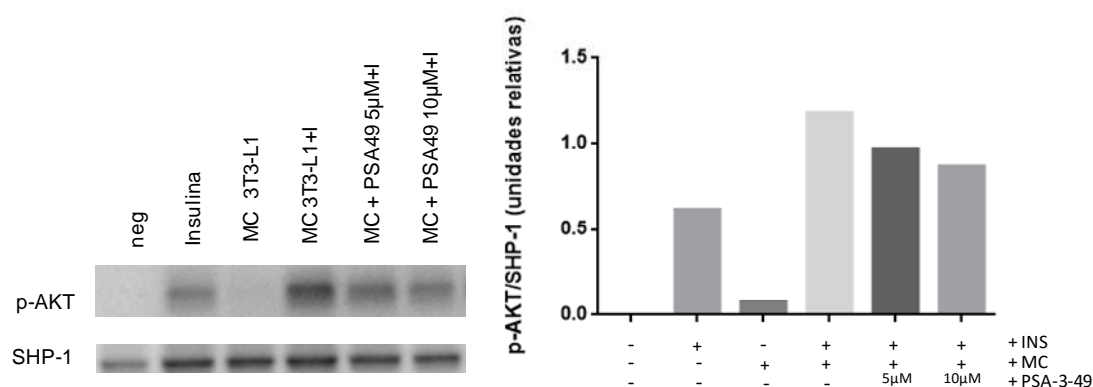


Figura 45: Análisis mediante western blot del efecto del compuesto PSA-3-49 sobre la fosforilación de AKT en células Hepa cultivadas durante 2 horas con el medio condicionado de adipocitos 3T3-L1 diferenciados, estimuladas con insulina (2,5µg/ml) y tratadas con el compuesto PSA-3-49 a distintas concentraciones durante 1 hora. Se analizó los valores densitométricos de p-AKT normalizados con SHP-1 en el lisado celular de un experimento representativo.

Sin embargo el compuesto no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de AKT (basal o inducida por insulina) en condiciones similares en ausencia de MC de adipocitos (Figura 46).

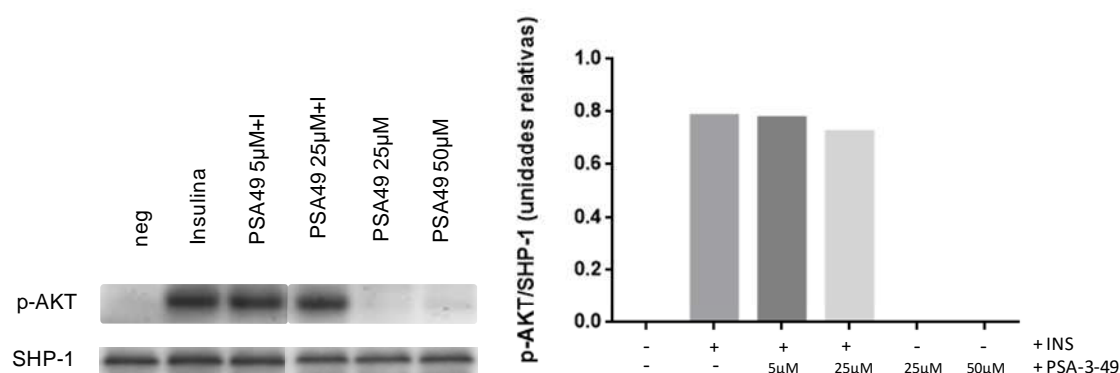


Figura 46: Análisis del efecto del compuesto PSA-3-49 sobre la expresión de AKT en células Hepa estimuladas con insulina (2,5µg/ml) y tratadas con el compuesto PSA-3-49 a distintas concentraciones durante 1 hora. Se analizó los valores densitométricos de p-AKT normalizados con SHP-1 en el lisado celular de un experimento representativo mediante western blot.

3. Análisis del compuesto EBM T78d como potencial agente anti-inflamatorio

El compuesto EBM T78d no resultó ser un buen ligando de FABP4 pero si disminuyó la producción de TNF- α por las células THP-1 dependiente de dosis por lo que podría ser un buen agente anti-inflamatorio. Para desarrollar nuestra hipótesis de que el compuesto EBM T78d tuviera efectos anti-inflamatorios analizamos más en profundidad sus propiedades.

3.1. Efectos sobre de la producción de TNF- α en diversos tipos celulares

A) Modulación de la respuesta a LPS en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y monocitos aislados de donantes sanos además de macrófagos derivados de médula ósea de ratón

Quisimos comprobar si los resultados obtenidos en la línea celular THP-1 pre-tratada con el compuesto EBM T78d (Figura 33 y Tabla 7) se ratificaban en células primarias, tanto PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) como monocitos aislados de donante sano.

Los resultados muestran una inhibición de la secreción de TNF- α en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) dependiente de dosis. Se observó una inhibición de la producción de TNF- α a 5 y 10 μ M en todos los experimentos (Figura 47 A).

En monocitos se produjo una inhibición de la producción de TNF- α dependiente de dosis tras el pre-tratamiento con el compuesto EBM T78d (Figura 47 B).

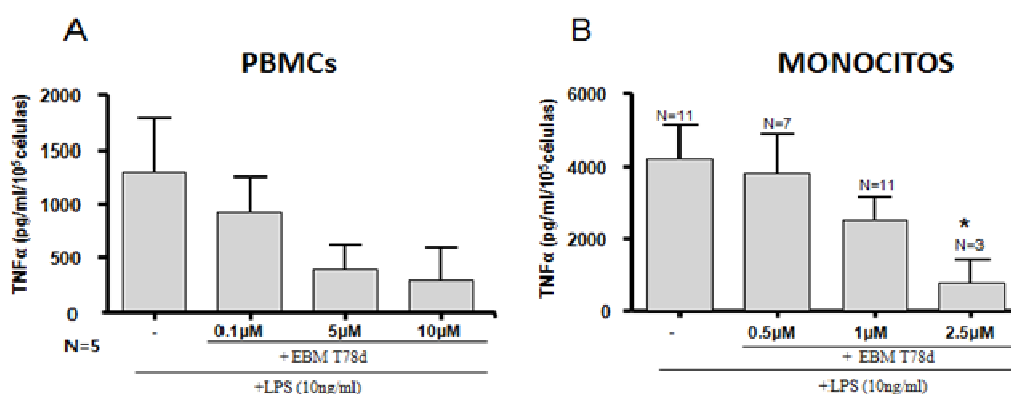


Figura 47: Evaluación de la producción de TNF- α en respuesta a LPS (10ng/ml, 4 horas) por células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (A) y monocitos purificados (B) pre-tratadas o no con el compuesto EBM T78d durante 24 horas. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 5 experimentos (A) y 11 experimentos (B). *p < 0,05 (test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples).

Calculamos la IC₅₀ del compuesto EBM T78d en PBMCs (2,65 μ M) y en Monocitos (2,01 μ M) sobre la producción de TNF- α (Tabla 9).

% Inhibición de la producción de TNF-α							IC ₅₀ (μM)
Concentración EBM T78d	0,1μM	0,5μM	1μM	2,5μM	5μM	10μM	
Tipos celulares							
PBMCs	22,7	N.D	38,8	N.D	71,2	69,2	2,65
Monocitos	N.D	21,44	38,15	62,18	92,6	96,46	2,01

Tabla 9: Porcentaje de Inhibición de la producción de TNF- α en células primarias (PBMCs y Monocitos) preincubadas durante 24h con dosis crecientes del compuesto EBM T78d y estimuladas durante 4 h con LPS (10ng/ml).

IC₅₀: concentración inhibidora al 50%. N.D no determinado.

Se obtuvieron macrófagos de la médula ósea de ratón, se pre-trataron 12 horas con el compuesto y posteriormente se estimularon durante 4 horas con LPS (10ng/ml). Se midieron las concentraciones de MCP-1 y TNF- α en el sobrenadante celular. Mientras que la producción de MCP-1 no se vio afectada, los niveles de TNF- α disminuyeron cuando se trataron los macrófagos con el compuesto a 1 μ M (Figura 48).

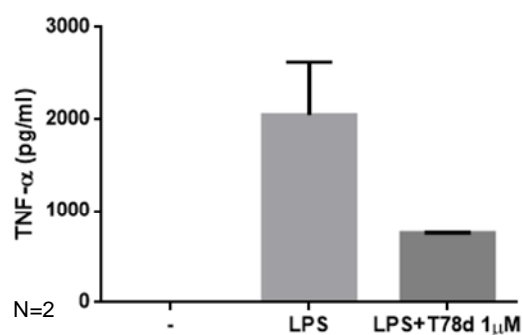


Figura 48: Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la producción de TNF- α en macrófagos de médula ósea de ratón. Se trataron los macrófagos con el compuesto EBM T78d (1 μ M) durante 12 horas, se estimularon con LPS (10ng/ml) durante 4 horas y se analizó la concentración de TNF- α en el sobrenadante celular mediante la técnica de ELISA. Los valores se muestran como la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes.

B) Modulación de la respuesta a poly I:C en monocitos aislados y en células dendríticas (DCs) diferenciadas in vitro

Anteriormente hemos estudiado la respuesta a LPS (ligando de TLR4) y quisimos estudiar también si el compuesto EBM T78d inhibe la estimulación a través de otros TLRs.

El poly I:C es un sintético análogo de RNA viral que estimula el receptor intracelular TLR3 y se ha utilizado en diferentes trabajos para simular in vitro infecciones virales, en células B, macrófagos y células dendríticas produciendo una respuesta inflamatoria (Ranjith-Kumar et al., 2007).

En estos experimentos los monocitos se purificaron mediante adherencia a plástico (ver material y métodos). Para la diferenciación a células dendríticas inmaduras (iDCs), la fracción adherente se cultivó en medio RPMI 10% FBS, GM-CSF (500u/ml) e IL-4 (100u/ml) durante 6 días cambiando el medio cada 2 días. La diferenciación se verificó mediante citometría de flujo comprobando que la población obtenida presentaba un fenotipo de iDCs caracterizado por la pérdida de expresión del receptor CD14 y la adquisición de los marcadores celulares CD80, CD83, DC-SIGN y CD1a (Figura 49).

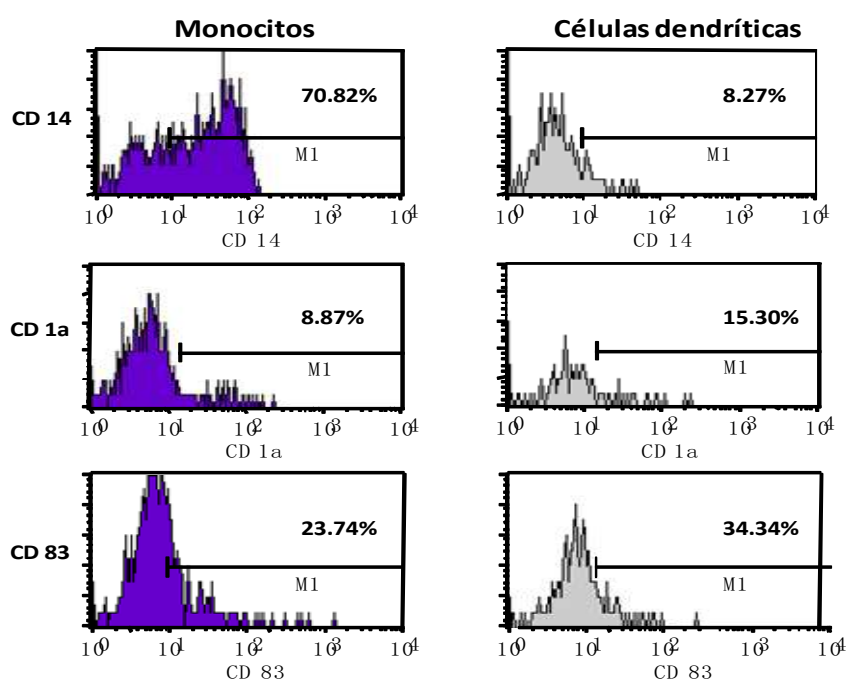


Figura 49: Expresión de CD14, CD1a y CD83 en monocitos y células dendríticas inmaduras (iDCs).

Monocitos primarios e iDCs se cultivaron durante 1 hora con concentraciones crecientes del compuesto EBM T78d y posteriormente se estimularon con poly I:C (10µg/ml, O/N). Como se aprecia en la figura 50, el compuesto EBM T78d inhibió la producción de TNF-α en respuesta a

poly I:C tanto en monocitos humanos como en células dendríticas de forma dependiente de dosis.

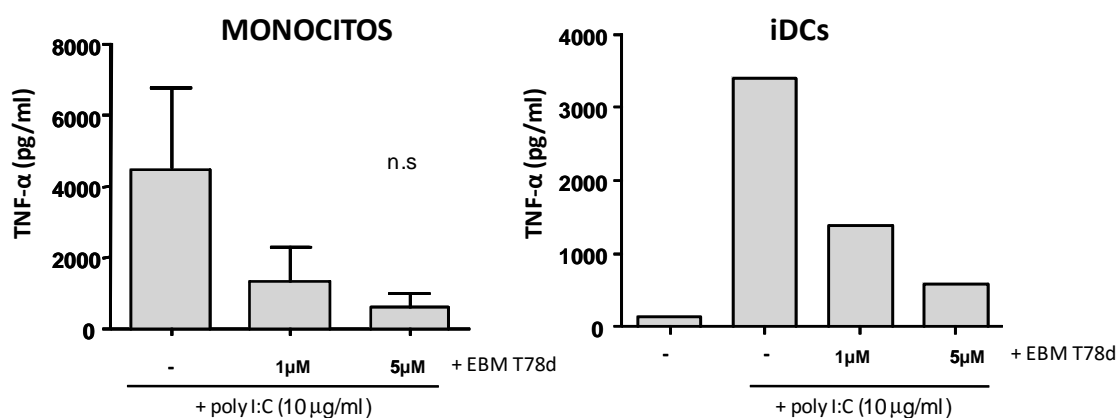


Figura 50: Evaluación de la producción de TNF- α en respuesta a poly I:C (10 μ g/ml, O/N) por monocitos purificados y células dendríticas inmaduras pre-tratadas o no con el compuesto EBM T78d durante 1 hora. La concentración de TNF- α en el sobrenadante celular se evaluó mediante ELISA. Los datos muestran el valor medio \pm error estándar de 3 experimentos (monocitos) y 1 experimento representativo (iDCs) (n.s.: test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples).

3.2 Efectos del compuesto EBM T78d sobre la producción de otras citoquinas en distintos tipos celulares

A) Efectos sobre la línea celular THP-1 estimulada con LPS

Se cultivaron células THP-1 durante 12 horas en presencia o ausencia de concentraciones crecientes del compuesto EBM T78d dentro de los rangos que no mostraron toxicidad anteriormente y se estimularon las células con 100 ng/ml de LPS durante las últimas 4 horas. La concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8 e IL-6 se midió en el sobrenadante de cultivo y en todos los casos se observó una inhibición de la producción de estas citoquinas de forma dependiente de dosis (Figura 51). También se cuantificó la quimioquina MCP-1 y aunque se estimuló la producción de MCP-1 con LPS no se inhibió tras el tratamiento de EBM T78d (datos no mostrados).

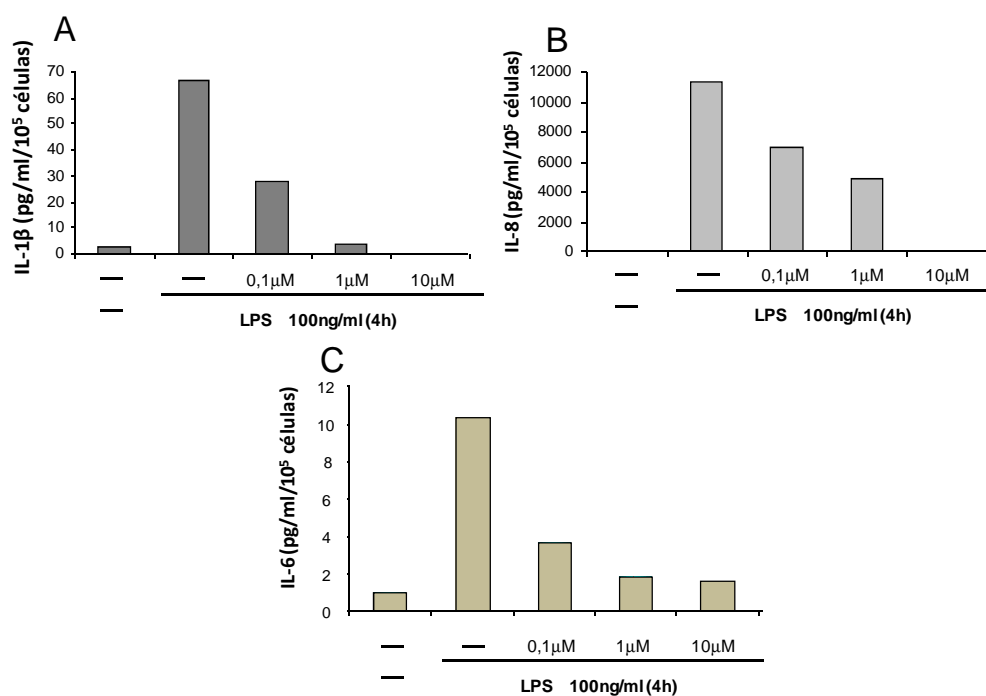


Figura 51: Evaluación de la producción de las citoquinas proinflamatorias A) IL-1β, B) IL-8 y C) IL-6 en respuesta a LPS (100ng/ml, 4 horas) por células THP-1 pre-tratadas o no con el compuesto EBM T78d durante 12 horas. La concentración de IL-1β, IL-8 e IL-6 en el sobrenadante celular se evaluó mediante CBA. Los datos se muestran como el valor de 1 experimento representativo.

B) Efecto sobre monocitos humanos aislados de sangre periférica estimulados con LPS (10ng/ml) durante 4h

Se analizó el efecto del compuesto EBM T78d sobre la producción de IL-6 e IL-10 en monocitos primarios CD14⁺ estimulados con LPS (10ng/ml) durante 4 horas. La producción de ambas citoquinas resultó inhibida tras el pre-tratamiento con el compuesto EBM T78d a 1 μM (IL-6) y a 5 μM (IL-10) (Figura 52). Se analizaron también tanto IL-1β, IL-8 y MCP-1 sin que se produjera ningún cambio significativo (datos no mostrados).

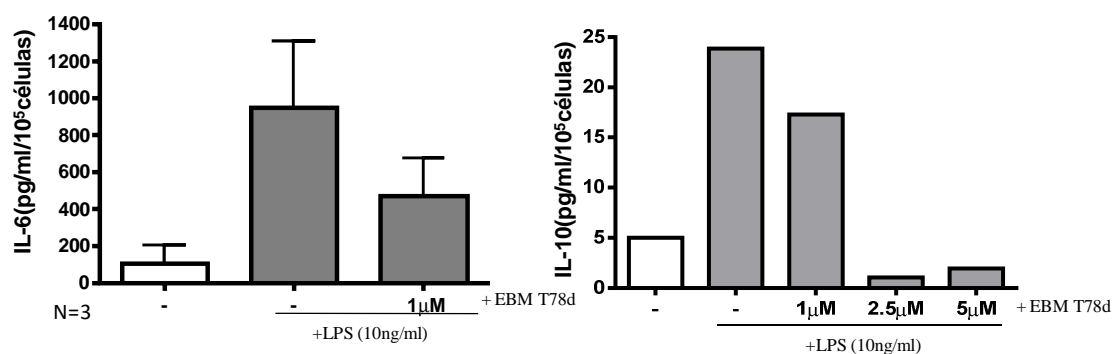


Figura 52: Inhibición de la producción las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-10 en monocitos humanos purificados CD14+ tras el pre-tratamiento con el compuesto EBM T78d y estimuladas con LPS (10ng/ml) durante 4 horas. Los datos se muestran como el valor medio de triplicados de 3 experimentos (IL-6) y un experimento representativo (IL-10).

C) Efecto sobre la estimulación con Poly I:C en monocitos y células dendríticas inmaduras (iDCs)

Se aislaron monocitos de sangre periférica de donantes sanos mediante adherencia a plástico. El pre-tratamiento de los monocitos con el compuesto EBM T78d produjo una inhibición de la producción de la quimioquina MCP-1 en respuesta a la posterior estimulación con poly I:C (Figura 53 A).

En paralelo se diferenciaron monocitos a células dendríticas inmaduras. El pretratamiento de las mismas con el compuesto produjo igualmente una inhibición tanto de la producción de IL-12 como de MCP-1 en respuesta a la estimulación con poly I:C (Figura 53 B,C).

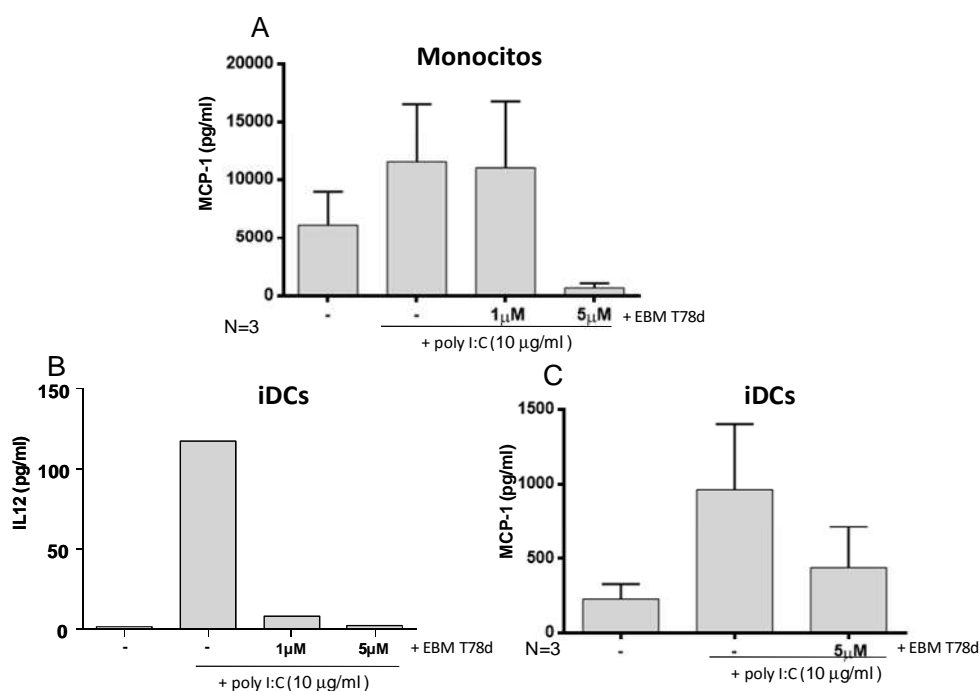


Figura 53: Inhibición de la producción de MCP-1 e IL-12 por el compuesto EBM T78d (1h) en monocitos (A) y células dendríticas (iDCs) (B,C) en respuesta a poly I:C (10 µg/ml) O/N. Los datos se muestran como el valor medio de triplicados de 3 experimentos en monocitos y 1 experimento representativo en iDCs para IL-12 (B) y 3 experimentos para MCP-1 (C). (n.s.: test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples).

D) Modulación de la respuesta a IL-4 en monocitos

Tanto en humanos como en ratones, la inflamación sistémica asociada a obesidad está caracterizada por una infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y el hígado (Weisberg et al., 2003). Los macrófagos pueden clasificarse en M1 o “clásicamente activados” y son macrófagos proinflamatorios y M2 o “alternativamente activados” que algunos autores los consideran como macrófagos anti-inflamatorios (Lumeng et al., 2007). Para profundizar en el efecto del compuesto en situaciones inflamatorias, diferenciamos los monocitos hacia un estado M2 y analizamos una citoquina característica de este tipo celular como es CCL18. Los monocitos primarios diferenciados por adherencia a plástico se estimularon con IL-4 (100 u/ml) para diferenciarlos hacia un fenotipo M2 durante 48 horas o 5 días y posteriormente se trataron durante 18 horas con el compuesto EBM T78d a distintas concentraciones (Figura 54).

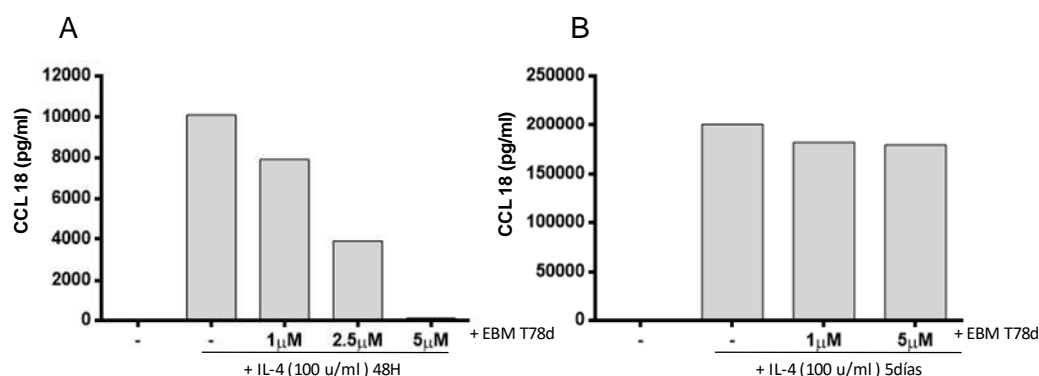


Figura 54: Inhibición de la producción de CCL18 en el sobrenadante celular de monocitos tratados con IL-4 (100u/ml) 48 horas (A) o 5 días (B) y estimulados con el compuesto EBM T78d 18 horas a distintas concentraciones. Los datos se muestran como el valor medio de triplicados de un experimento representativo.

Como se muestra en la Figura 54, en ambas situaciones la IL-4 estimuló la producción de CCL18. El compuesto inhibió la producción de la quimioquina en células tratadas con IL4 durante 48 horas; pero no alteró la producción de CCL18 en monocitos plenamente diferenciados a M2 tras el tratamiento durante 5 días con IL4.

E) Efecto del compuesto EBM T78d sobre adipocitos humanos

Obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 son tres enfermedades interrelacionadas que comparten mecanismos de aparición y evolución y con frecuencia se van combinando sucesivamente y ocasionan complicaciones cardiovasculares (Eeg-Olofsson et al., 2009). Varios grupos de investigación sugieren que la obesidad da lugar a un estado de inflamación crónica que contribuye a la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Lumeng et al., 2007, Canello and Clement, 2006, Gregor and Hotamisligil, 2011, Ouchi et al., 2011).

El tejido adiposo es el órgano endocrino productor de varias moléculas (adipoquinas) como la leptina, resistina y adiponectina además secreta moléculas inflamatorias como IL-6 y TNF- α (de Oliveira et al., 2015). Diversos estudios han observado un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en tanto aumentan los macrófagos y otras células inmunes en el tejido adiposo de ratones y humanos obesos (Pedersen et al., 2015). Por lo tanto el estado proinflamatorio del tejido adiposo en obesidad es considerado como el evento clave de la disfunción metabólica local y sistémica (Kwon and Pessin, 2013). En consecuencia, la supresión de genes proinflamatorios podría ser una estrategia terapéutica para mejorar la acción de la insulina en el tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa sistémica (Aouadi et al., 2013). Siguiendo esta hipótesis de trabajo quisimos comprobar si el compuesto EBM T78d

podría inhibir la producción de leptina e IL-6 en células madre mesenquimales (pre-adipocitos) y en adipocitos maduros .

Se aislaron células madre mesenquimales a partir de restos quirúrgicos de tejido adiposo humano y se diferenciaron a adipocitos según protocolos descritos (Zuk et al., 2001). Tanto las células madre mesenquimales (pre-adipocitos) como los adipocitos diferenciados se trataron con concentraciones crecientes del compuesto EBM T78d durante 24 horas y posteriormente se estimularon durante 24 horas (Figura 55 A, B) o 48 horas (Figura 55 C) con 50 ng/ml de LPS. El pretratamiento con el compuesto EBM T78d inhibió la producción de IL-6 y la producción de leptina en adipocitos humanos de forma dependiente de dosis (Figura 55 B, C). En el caso de las células madre mesenquimales también se inhibió la producción de IL-6 de forma dependiente de dosis tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d (Figura 55 A) aunque no ocurrió lo mismo con la quimioquina MCP-1 (datos no mostrados).

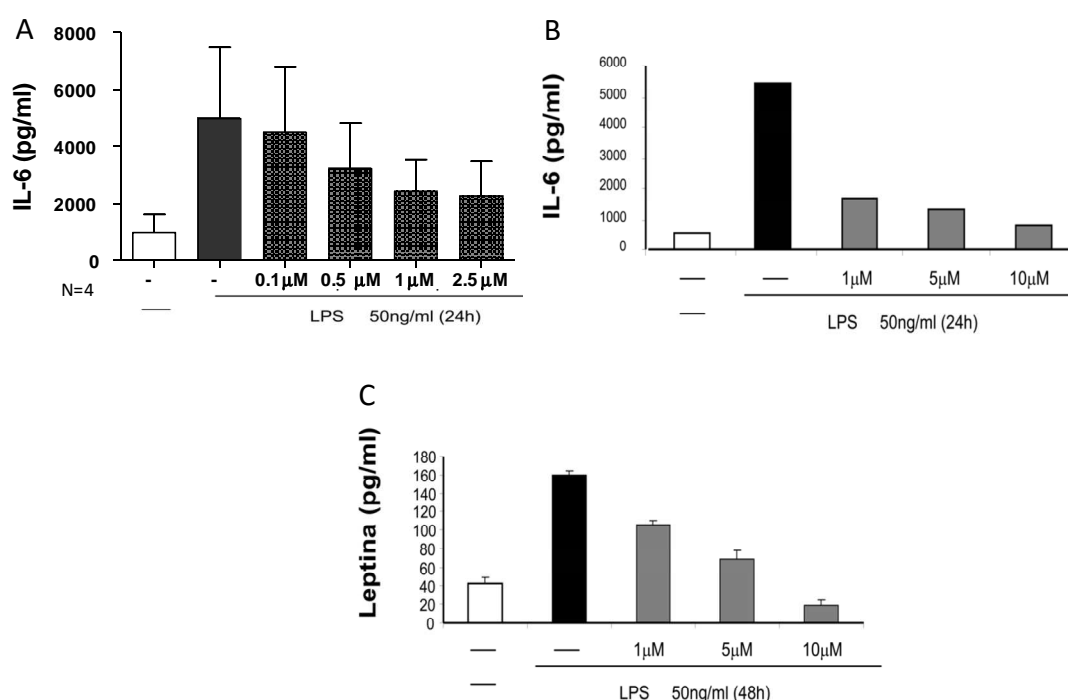


Figura 55: Inhibición de la producción de las adipocitoquinas IL-6 y leptina en células madre mesenquimales (A) y adipocitos humanos maduros generados in vitro (B,C). Los cultivos se trataron con diferentes concentraciones del compuesto EBM T78d durante 24 horas y posteriormente fueron estimulados con LPS (50ng/ml) durante 24 o 48 horas adicionales. La concentración de IL-6 se determinó en los sobrenadantes de cultivo mediante citometría de flujo y CBA como se ha descrito anteriormente mientras que la concentración de leptina se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio de triplicados de 4 experimentos (A)(n.s: test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples) y un experimento representativo (B,C).

3.3 Modulación de la expresión génica por el compuesto EBM T78d

Mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales han sido involucrados en la regulación de la producción de TNF- α por células del sistema inmune (Shebzukhov *et al.* and Kuprash, 2011). Para explorar si el compuesto EBM T78d puede inhibir la expresión de diferentes citoquinas a nivel transcripcional se llevaron a cabo estudios de RT-PCR a tiempo real en varios tipos celulares.

A) Línea celular THP-1

Para estudiar la expresión génica de la citoquina proinflamatoria TNF- α en respuesta a LPS en la línea celular THP-1 se realizó primeramente una cinética con objeto de obtener el tiempo óptimo de estimulación. Los niveles de ARNm de TNF- α se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa a distintos tiempos, obteniendo el máximo de expresión génica tras la estimulación durante 2 horas (Figura 56).

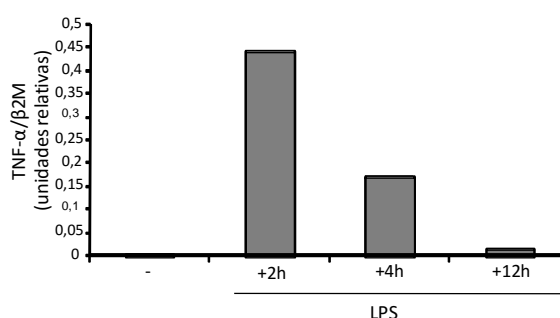


Figura 56: Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de TNF- α en la línea celular THP-1 tras la estimulación de LPS (100ng/ml). Se muestra un experimento representativo de 2 realizados con resultados similares. Los resultados se expresan como unidades relativas tras la normalización frente al ARNm de β 2 microglobulina cuantificado en la mismas muestras.

En los siguientes experimentos la línea celular THP-1 se cultivó en presencia del compuesto EBM T78d (1 μ M) durante 18 horas, tras las cuales se estimuló con LPS (100ng/ml) durante 2 horas. Los niveles de ARNm de TNF- α se evaluaron mediante RT-PCR cuantitativa. Como se muestra en la Figura 57, el pre-tratamiento con el compuesto produjo una disminución en los niveles de expresión de TNF- α .

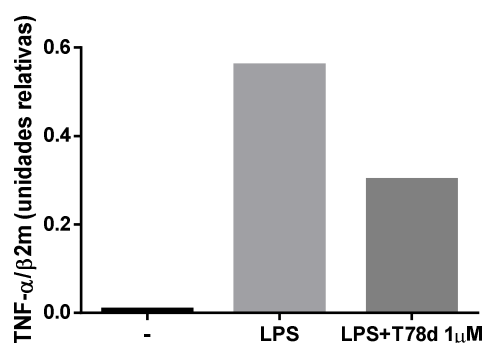


Figura 57: Expresión de TNF-α en la línea celular THP-1 tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d a 1μM durante 18 horas y la estimulación con LPS (100ng/ml) durante 2 horas. Los valores se muestran como unidades relativas tras la normalización frente al ARNm de β2 microglobulina cuantificado en la mismas muestras.

B) Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y Monocitos primarios humanos

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Figura 58) y monocitos primarios humanos (Figura 59) se aislaron a partir de donaciones de sangre de individuos sanos como en los apartados anteriores, se cultivaron durante 18 horas en presencia de concentraciones crecientes del compuesto EBM T78d y posteriormente se estimularon con LPS (10ng/ml) durante 2 horas. Se aisló ARN de los cultivos y los niveles del mensajero de TNF-α (en el caso de PBMCs) y de TNF-α, IL-8 e IL-6 (en el caso de monocitos) se cuantificaron mediante transcripción inversa y PCR cuantitativa.

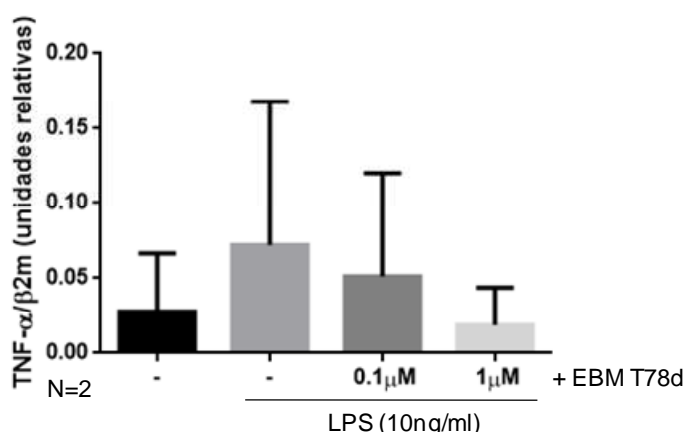


Figura 58: Expresión de TNF-α en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d a distintas dosis durante 18 horas y la estimulación con LPS (10ng/ml) durante 2 horas. Los valores se expresan como unidades relativas tras la normalización frente al ARNm de β2 microglobulina cuantificado en la mismas muestras. Se muestra el valor medio ± error estándar de 2 experimentos independientes.

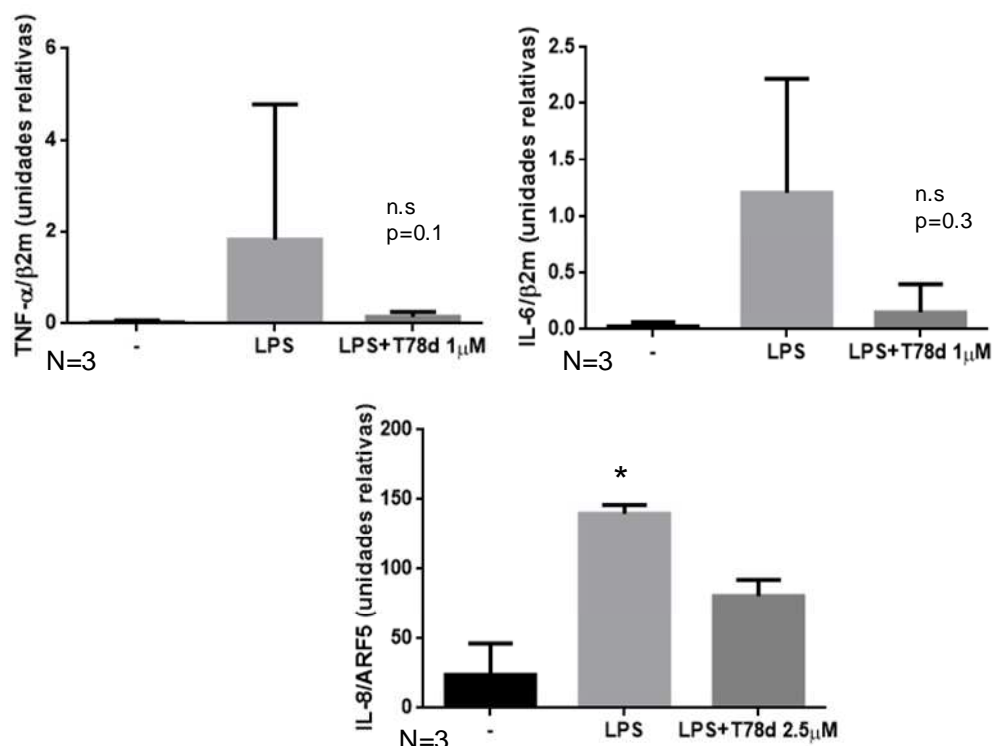


Figura 59: Expresión de TNF- α , IL-6 e IL-8 en monocitos humanos tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d a distintas dosis durante 18 horas y la estimulación con LPS (10ng/ml) durante 2 horas. Los valores se expresan como unidades relativas tras la normalización frente al ARNm de $\beta 2$ microglobulina o ARF5 cuantificado en la mismas muestras. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0,05$ (test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples), n.s: no significativo.

La expresión de TNF- α disminuyó tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d a 1 μ M tanto en células mononucleares de sangre periférica (Figura 58) como en monocitos purificados (Figura 59).

Evaluamos también los niveles de expresión de IL-6 e IL-8 en monocitos y comprobamos que se produjo una inhibición de la transcripción de ambas citoquinas tras el tratamiento con el compuesto a 1 μ M (en el caso de la expresión de IL-6) y a 2,5 μ M (en el caso de la expresión de IL-8).

C) Pre-adipocitos y adipocitos maduros

Tanto las células madre mesenquimales (pre-adipocitos) como los adipocitos diferenciados se trataron con concentraciones crecientes del compuesto EBM T78d durante 24 horas y los cultivos fueron posteriormente estimulados durante 24 horas con 50 ng/ml de LPS.

El pre-tratamiento con dosis bajas del compuesto EBM T78d inhibió la expresión de IL-6 en células mesenquimales pero parece que no funcionaría igual en adipocitos diferenciados *in vitro* (Figura 60).

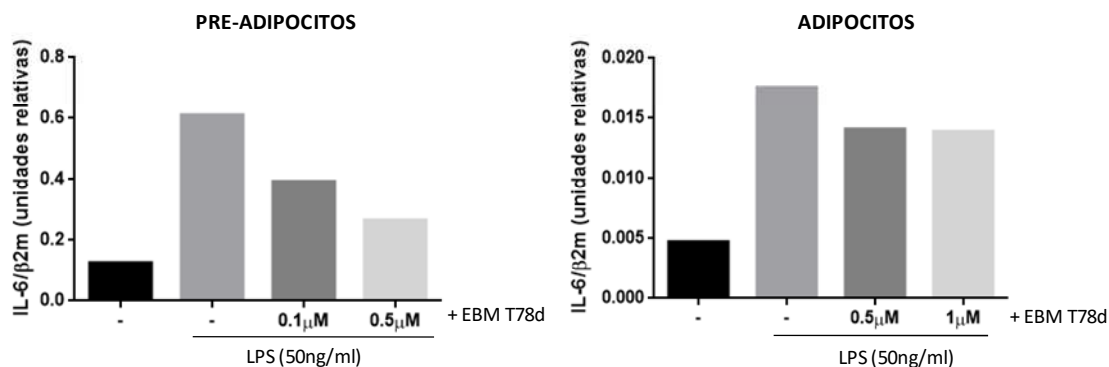


Figura 60: Expresión de IL-6 en células madre mesenquimales (pre-adipocitos) y adipocitos diferenciados *in vitro* tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d a distintas dosis durante 24 horas y la posterior estimulación con LPS (50ng/ml) durante 24 horas adicionales. Los valores se muestran como unidades relativas tras la normalización frente al ARNm de β 2 microglobulina cuantificado en la mismas muestras.

Además de la expresión de IL-6 quisimos analizar el efecto del compuesto EBM T78d sobre los niveles de expresión de la proteína FABP4 en adipocitos maduros y cuya expresión aumentó tras en tratamiento con LPS. Como se muestra en la Figura 61, el pre-tratamiento con el compuesto EBM T78d a 1 μ M bloqueó la inducción de FABP4 por LPS.

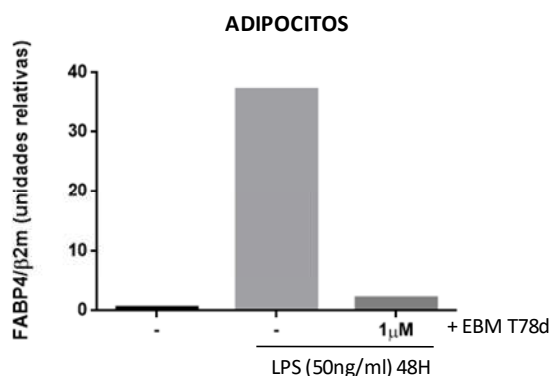


Figura 61: Expresión de FABP4 en adipocitos diferenciados tras el tratamiento con el compuesto EBM T78d a 1 μ M durante 24 horas y la estimulación con LPS (50ng/ml) durante 48 horas. Los valores se muestran como unidades relativas tras la normalización frente al ARNm de β 2 microglobulina cuantificado en la mismas muestras de un experimento representativo.

3.4 Análisis de la modulación de la actividad NF- κ B por el compuesto EBM T78d

NF- κ B es un factor de transcripción que juega un papel clave en la regulación de la inflamación (Oeckinghaus et al., 2011, Ghosh et al., 2012). Su actividad aumenta por el tratamiento de diferentes estímulos como el LPS y se transloca al núcleo iniciando la expresión génica de varios mediadores inflamatorios (Lee and Lee, 2014).

Con objeto de analizar si el compuesto EBM T78d afectaba a la actividad del factor de transcripción NF- κ B, la línea celular COS-7 se transfectó con el vector NF κ B-luc en el que la expresión del gen luciferasa se encuentra bajo el control de un promotor mínimo precedido por tres sitios NF- κ B. La actividad del promotor y subsecuente expresión del gen reportero se indujo mediante el tratamiento con LPS (100ng/ml) y TNF- α (10ng/ml) durante 2 horas como muestra la figura 62 A.

El pre-tratamiento durante 18 horas con el compuesto EBM T78d (1 μ M) bloqueó la inducción de la expresión del gen reportero evaluada mediante la cuantificación por RT-PCR cuantitativa del ARN mensajero de luciferasa. En paralelo se cuantificó el mensajero del gen ribosomal ARF5 como control endógeno (Figura 62 B).

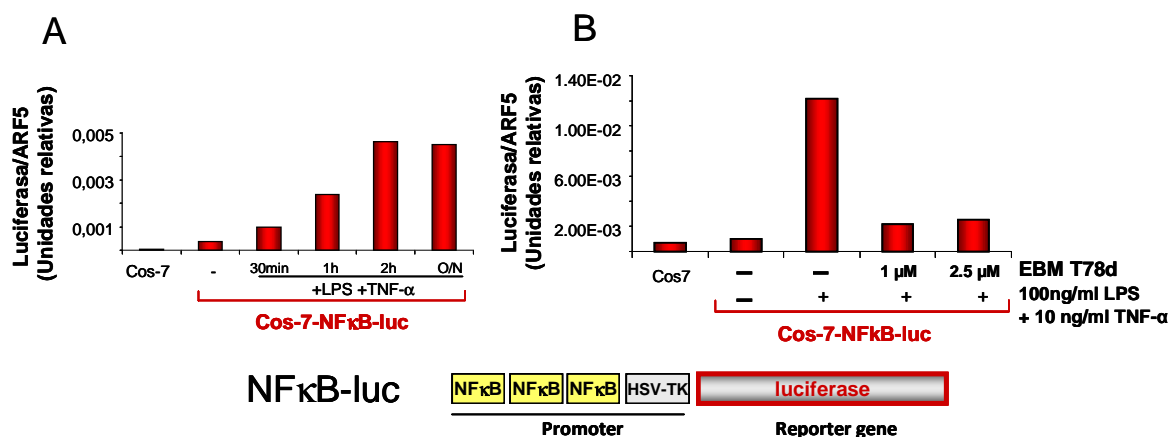


Figura 62: A) Cinética de expresión del gen reportero luciferasa en la línea celular COS-7 transfectada con el vector NF κ B-luc tras la estimulación con LPS (100ng/ml) y TNF- α (10ng/ml) durante 2 horas. B) Expresión de luciferasa en la línea celular COS-7 transfectada con el vector NF κ B-luc tras el pre-tratamiento con el compuesto EBM T78d (1 μ M o 2,5 μ M) durante 18 horas y la estimulación con LPS (100ng/ml) y TNF- α (10ng/ml) durante 2 horas. Los resultados se expresan como unidades relativas tras la normalización de las moléculas de ARNm de luciferasa en relación con el número de moléculas de mRNA de ARF5 detectadas en las mismas muestras de un experimento representativo.

3.5 Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la fosforilación de las proteínas quinasas p38 y JNK

A la vista de los resultados que obtuvimos con la inhibición de la actividad de NF- κ B por el compuesto, quisimos profundizar más en los mecanismos de señalización y analizar la fosforilación de dos proteínas quinasas como son P38 y JNK mediante la técnica de western blot.

La línea celular THP-1 se cultivó en presencia del compuesto EBM T78d durante 18 horas, tras las cuales se estimuló con LPS (100ng/ml) durante 4 horas. Las células se lisaron y se obtuvieron los extractos de proteínas totales. Además como control del experimento se midió la concentración de TNF- α en el sobrenadante celular comprobando que el tratamiento con el compuesto disminuyó la respuesta a LPS.

No se apreciaron diferencias en los niveles de fosforilación de p38 (datos no mostrados) en cambio, el compuesto EBM T78d si podría disminuir la fosforilación de JNK inducida por LPS a concentraciones bajas (Figura 63).

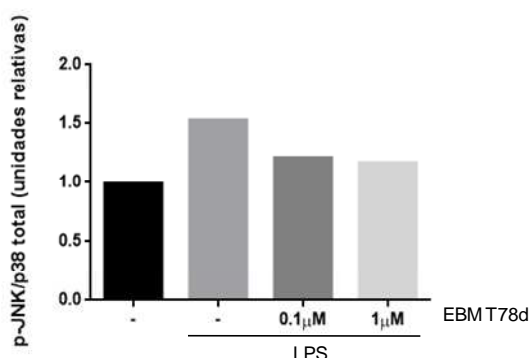


Figura 63: Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la fosforilación de JNK en la línea celular THP-1. Se cultivó la línea THP-1 al 80% HL1 en presencia del compuesto EBM T78d durante 18 horas y posteriormente se estimuló con LPS (100ng/ml) durante 4 horas. Se analizaron los valores densitométricos de p-JKN normalizados con p38 total en los extractos de proteínas totales de un experimento representativo.

3.6 Análisis del efecto de la administración *in vivo* del compuesto EBM T78d

Los datos previos demostraron un efecto inhibidor del compuesto EBM T78d *in vitro*. Seguidamente nos planteamos analizar los efectos del compuesto *in vivo* en varios modelos de ratón.

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL6 (Charles River, Barcelona, España) y se mantuvieron en jaulas ventiladas para minimizar la infección por patógenos. Los ratones utilizados tenían 8-11 semanas de edad y un peso aproximado de 20 gramos.

A) Modelo de diálisis peritoneal en ratón

En estudios previos se observó que el líquido de diálisis en la cavidad peritoneal induce la aparición de un fenómeno inflamatorio crónico (Gonzalez-Mateo et al., 2009, Sandoval et al., 2010). Nos planteamos por tanto analizar los efectos anti-inflamatorios del compuesto en el modelo de diálisis peritoneal en ratón. Realizamos un experimento en 50 ratones sometidos al modelo de DP durante 1 mes en presencia o ausencia del compuesto EBM T78d (ver material y métodos). El modelo no funcionó ya que no se engrosaron las membranas peritoneales con la inyección del líquido de diálisis y no pudimos comprobar el efecto del compuesto sobre el modelo de inflamación inducida por la DP (Figura 64).

Tras el mes de tratamiento diario con el líquido de diálisis y el compuesto, los ratones se encontraron en buenas condiciones por lo que sí pudimos concluir que el compuesto no resultó tóxico a las dosis administradas. Además se analizaron varios órganos como el hígado y el riñón comprobando que no existían alteraciones anatómico-patológicas.

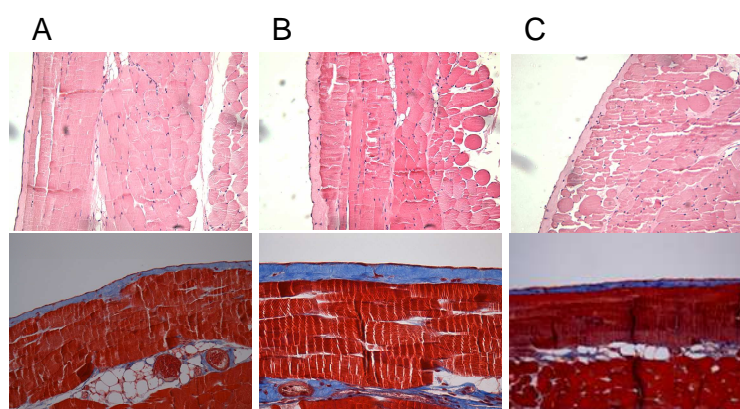


Figura 64: Cortes de membrana peritoneal teñidos con hematoxilina-eosina (paneles superiores) y tricrómico de Masson (paneles inferiores) de un ratón representativo A. Grupo control sin cateter, B. Grupo tratado con el líquido de diálisis Stay Safe 4,25%, C. Grupo tratado con el líquido de diálisis y el compuesto EBM T78d a 2,5 μ M.

B) Modelo de inflamación inducido por LPS intraperitoneal

Realizamos un primer experimento con ratones control y ratones en los que se inyectó LPS (30 μ g/ratón) intraperitonealmente 4 horas antes del sacrificio. Comprobamos que los niveles

de las citoquinas TNF- α y MCP-1 se encontraban aumentados en el lavado peritoneal de los ratones tratados con LPS siendo el porcentaje de células F4/80+ (marcador de macrófagos de ratón) muy parecido en ambos grupos (Figura 65). El tratamiento con LPS durante 4 horas no resultó tóxico para los animales.

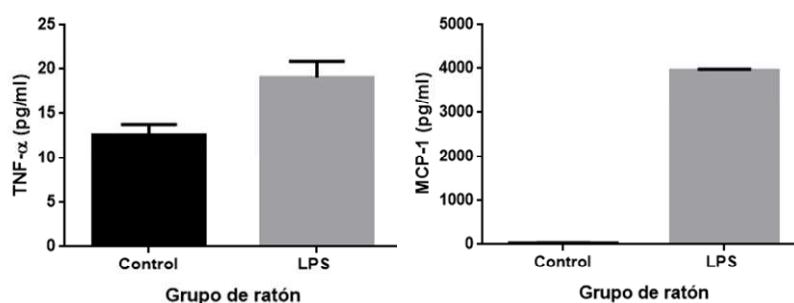


Figura 65: Aumento de la producción de TNF- α y MCP-1 en el lavado peritoneal de ratones 4 horas tras la inyección intraperitoneal de LPS (30 μ g). Se muestran resultados de 2 ratones por grupo.

A la vista de estos resultados preliminares elaboramos un modelo de ensayo en el que se administraron intraperitonealmente 2 dosis del compuesto EBM T78d (200 μ l, 0,1 μ M en suero salino) con un intervalo de 18 horas y posteriormente se inyectó LPS (30 μ g/ratón). Cuatro horas tras la administración de LPS se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical y se inyectó 1ml de PBS en la cavidad peritoneal para obtener el lavado peritoneal. Las células peritoneales se cultivaron en ausencia de estímulo (200.000 células/pocillo) y se recogieron los sobrenadantes tras 12 horas de cultivo. Se midieron TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-17 y MCP-1 tanto en el lavado peritoneal como en el sobrenadante de las células peritoneales; pero sólo la producción de TNF- α e IL-6 resultaron afectadas tras el pre-tratamiento con el compuesto EBM T78d (Figura 66).

De forma similar la producción de TNF- α e IL-6 se vieron disminuidas en células peritoneales en cultivo; aunque las diferencias no fueron significativas respecto a ratones que no fueron pre-tratados con T78d.

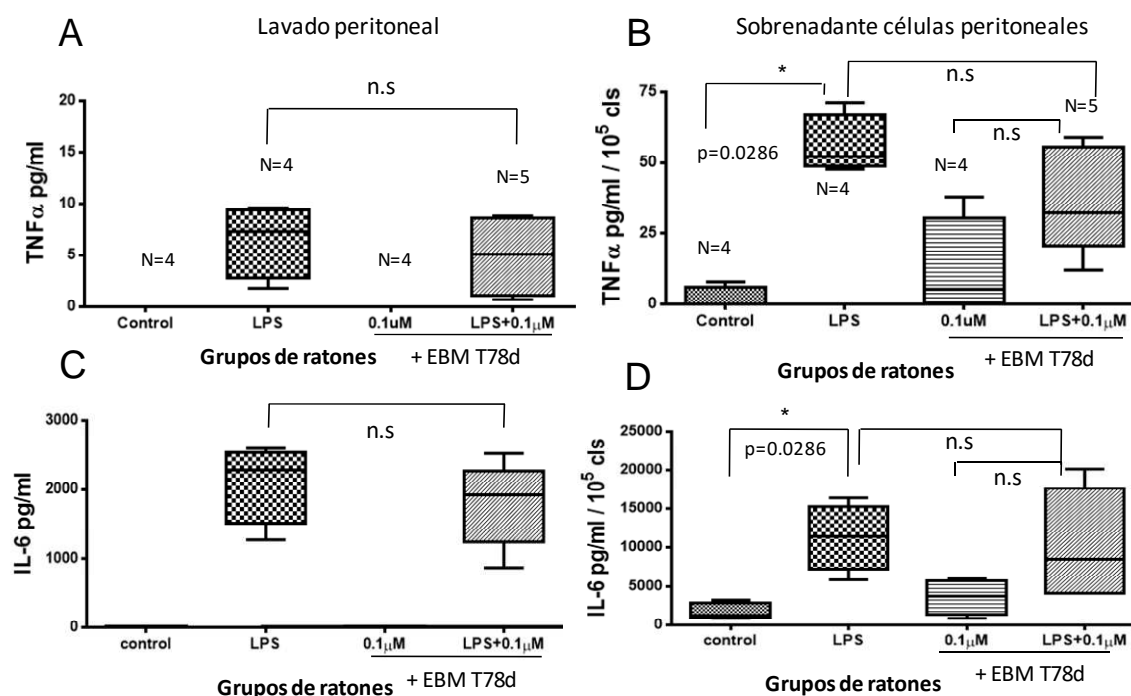


Figura 66: Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la concentración de citoquinas en el lavado peritoneal (A,C) y el sobrenadante de células peritoneales (B,D). Se administró intraperitonealmente el compuesto EBM T78d (0,1 μM) en ratones C57BL6 y al día siguiente se inyectó LPS 4h previas al sacrificio. Los niveles de TNF-α en el lavado peritoneal o el sobrenadante de cultivo de células peritoneales se midieron mediante ELISA y los niveles de IL-6 se evaluaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran como las medias de 4-5 ratones por grupo.*p < 0,05 (test de Mann-Whitney), n.s: no significativo.

A continuación se repitió el modelo de ensayo aumentando la dosis del compuesto EBM T78d para comprobar si aumentaban las diferencias entre los grupos, ya que el compuesto no resultaba tóxico. Se administraron de nuevo 2 dosis del compuesto EBM T78d (40 μg/ratón en 200 μl de suero salino) intraperitonealmente con un intervalo de 18 horas. A un grupo de los ratones además de llevar una dosis del compuesto durante 18 horas se le añadió las últimas 4 horas LPS (30 μg/ratón). En total tuvimos 4 grupos de ratones como se aprecia en la Figura 67.

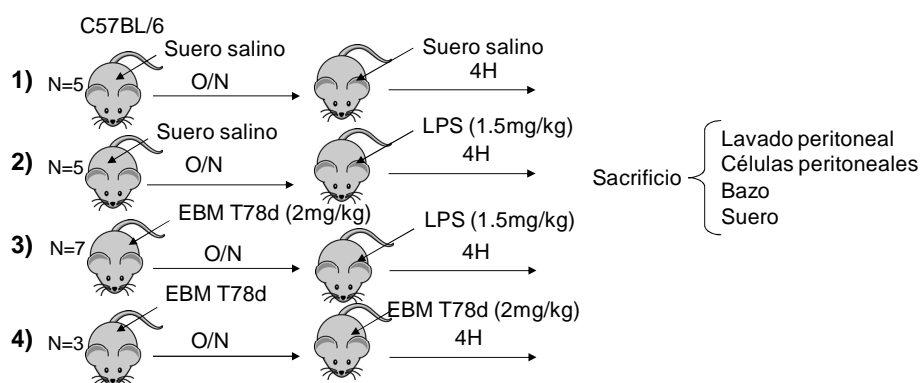


Figura 67: Modelo de ensayo in vivo del compuesto EBM T78d en el que se utilizaron 4 grupos de ratones y tras los estímulos se sacrificaron y obtuvieron el lavado peritoneal, células peritoneales que se cultivaron 12 horas para obtener el sobrenadante celular, suero y bazo de cada ratón.

Además se obtuvieron tanto el hígado como el riñón de cada ratón comprobando mediante tinción con hematoxilina-eosina que la histología de ambos órganos era normal, por lo que concluimos que las dosis administradas no fueron tóxicas.

No observamos alteraciones en el patrón de citoquinas en el lavado peritoneal. Sin embargo, en el sobrenadante de las células peritoneales cultivadas observamos una inhibición de la producción de IL-6 y MCP-1 en respuesta a LPS en los cultivos procedentes de ratones pre-tratados con el compuesto EBM T78d. La citoquina proinflamatoria TNF- α también fue analizada pero en este experimento los niveles fueron prácticamente indetectables en el grupo con LPS (Figura 68).

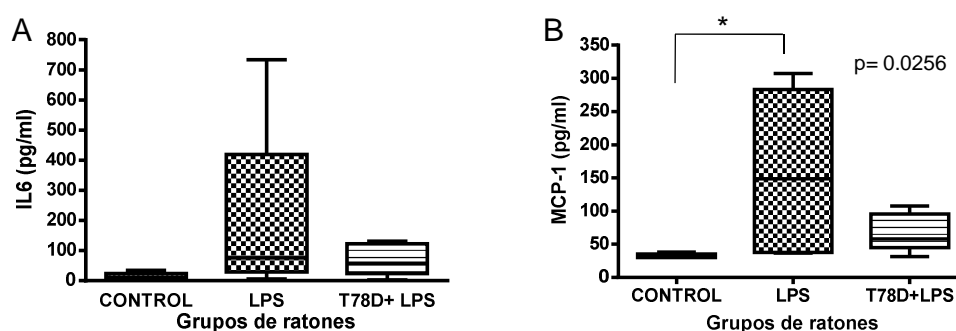


Figura 68: Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias en células peritoneales de ratón. Tras la administración intraperitoneal del compuesto T78d (2mg/kg) el día anterior, se inyectó LPS 4 h previas al sacrificio de los animales. Se aislaron células de la cavidad peritoneal mediante lavado con PBS y se cultivaron in vitro O/N sin estímulo adicional. A) Concentración de IL-6 en el sobrenadante de cultivo (pg/ml /2.10⁶ cells) n.s (test de Kruskal-Wallis). B) Concentración de MCP-1 en los sobrenadantes de cultivo (pg/ml/2.10⁶ cells):p=0,0256 (test de Kruskal-Wallis). Control vs LPS * p < 0,05(test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples)Control vs LPS+T78d n.s .

Adicionalmente se recogieron sueros de todos los ratones y se evaluó en los mismos la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 y MCP-1. Únicamente se detectó una disminución de la concentración de MCP-1 en ratones pre-tratados con T78d y

posteriormente inyectados con LPS ; aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al grupo de ratones que únicamente recibieron LPS (Figura 69).

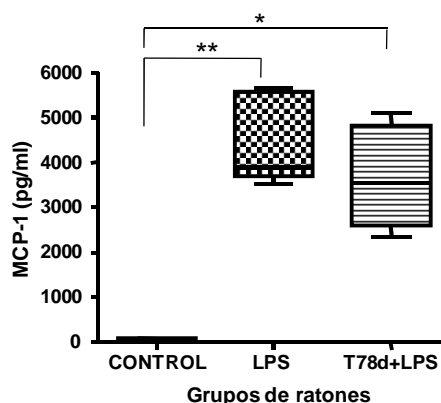


Figura 69: Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la concentración de MCP-1 en suero. Tras la administración intraperitoneal del compuesto T78d (2mg/kg) el día anterior, se inyectó LPS 4 h previas al sacrificio de los animales y se midió la concentración de MCP-1 circulante en suero en los distintos grupos de ratones. Control vs LPS $p=0,0067$ (** $p<0,01$). Control vs T78d+LPS $p=0,0454$ * $p<0,05$ (test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples).

A el grupo de ratones control (grupo 1 en la Figura 67) y al grupo de ratones en el que se administraron 2 dosis del compuesto (2mg/kg en 200 μ l de suero salino) con un intervalo de 18 horas (grupo 4 en la Figura 67), se extirparon los bazo y se disgregaron mecánicamente para obtener suspensiones celulares. Las células de bazo o esplenocitos se cultivaron *in vitro* en presencia o ausencia de LPS (10ng/ml) durante 4 horas midiendo los niveles de TNF- α , IL-6 y MCP-1 en el sobrenadante de cultivo mediante citometría de flujo (CBA). Como se aprecia en la figura 70, los esplenocitos de ratones que han sido tratados *in vivo* con el compuesto EBM T78d mostraron una producción significativamente menor de TNF- α cuando fueron estimuladas con LPS *in vitro*, mientras que los niveles de MCP-1 e IL-6 se mantuvieron inalterables (datos no mostrados). Este resultado indica que el compuesto fue efectivo cuando se administró *in vivo*, disminuyendo el potencial proinflamatorio de células del sistema inmune como los esplenocitos.

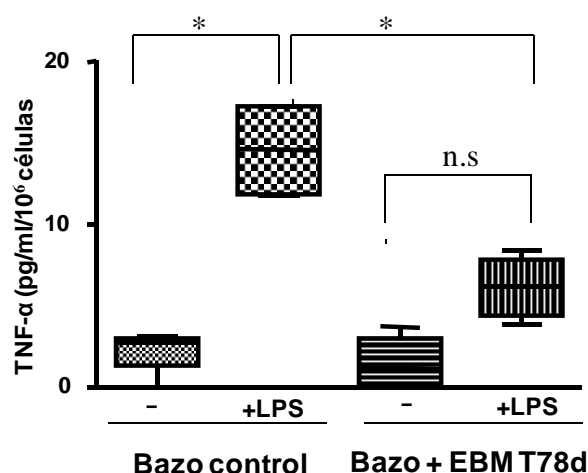


Figura 70: Análisis del efecto del compuesto EBM T78d sobre la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α en esplenocitos de bazo de ratón. Se administraron intra-peritonealmente 2 dosis de EBM T78d (2mg/kg) en ratones C57BL6 wild-type con un intervalo de 18h (4 ratones por grupo). 4h después de la segunda dosis se sacrificaron los animales y las células del bazo se trataron en presencia o ausencia de LPS 10ng/ml durante 4h. Se midieron mediante CBA los niveles de TNF- α en el sobrenadante de cultivo de. Control vs LPS $p = 0,0156$ (* $p < 0,05$) test de Wilcoxon. LPS vs T78d+LPS $p = 0,0205$ (* $p < 0,05$) test de Mann-Whitney.

4. FABP4 en pacientes en diálisis peritoneal: Implicaciones en riesgo cardiovascular y síndrome metabólico

Los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) muestran precozmente resistencia a la insulina, caracterizada por alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono con hiperinsulinemia que generalmente se asocia a dislipidemia y a un patrón proinflamatorio con niveles séricos alterados de adipocitoquinas (Kobayashi et al., 2005).

La diálisis peritoneal (DP) expone a los pacientes a una alta carga de glucosa que puede empeorar el estado de resistencia a la insulina y causar trastorno metabólico. Los pacientes en DP son por lo tanto más propensos a la resistencia a la insulina, la dislipidemia y la obesidad (Fortes et al., 2009).

Varios estudios confirman la asociación entre la resistencia a la insulina y la enfermedad cardiovascular en pacientes en DP (Tatar et al., 2012) y es particularmente importante porque la enfermedad cardiovascular (CV) constituye la principal causa de mortalidad en los pacientes en DP (Lowrie et al., 1973, Li et al., 2013).

4.1 Medición de FABP4 en pacientes en diálisis peritoneal

En humanos, se ha detectado FABP4 soluble en circulación, pero todavía no se ha establecido claramente su función biológica(Ishimura et al., 2013). Estudios recientes han demostrado que FABP4 es secretada por los adipocitos y que el nivel de FABP4 se asocia con obesidad, resistencia a la insulina y aterosclerosis(Xu et al., 2006, Tso et al., 2007, Yeung et al., 2007, Ota et al., 2012, Yeung et al., 2008, Bagheri et al., 2010).

Las concentraciones de FABP4 circulante se asocian a variables antropométricas y a la distribución de la grasa corporal y están aumentadas en los sujetos con sobrepeso u obesidad, en comparación con las personas delgadas(Xu et al., 2006).También está aumentado en mujeres en comparación con los hombres tanto en sujetos sanos como en pacientes de hemodiálisis(Furuhashi et al., 2011a). Además, se ha señalado que las concentraciones de FABP4 son un factor predictivo de la aparición de DM2 y síndrome metabólico, independiente de la obesidad y la resistencia a la insulina(Xu et al., 2007).Hay evidencias indirectas de que FABP4 circulante podría intervenir en la resistencia a la insulina y la dislipemia aterógena y fomentar la inflamación (Cabre et al., 2008).

Por lo tanto quisimos averiguar si los niveles circulantes de FABP4 en suero de pacientes en diálisis peritoneal con mayor o menor riesgo cardiovascular asociado podrían ser un buen predictor de riesgo cardiovascular.

Se reclutaron en nuestro estudio un total de 31 pacientes (23 hombres y 8 mujeres de entre 24 y 89 años de edad) de la unidad de diálisis peritoneal del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario La Paz, Madrid. Se recogieron 500 µl de suero de los pacientes a tiempo 0 y trascurridos 2 años desde el inicio de la diálisis y se evaluaron FABP4, CCL18 y leptina.

Según sus antecedentes clínicos dividimos los pacientes en aquellos sin enfermedad cardiovascular previa (riesgo 1) y con distintos niveles de riesgo (riesgo 2-5) según variables clínicas relacionadas con el síndrome metabólico (diabetes, obesidad, dislipemia, hipertensión, enfermedad vascular periférica) y aumento del riesgo cardiovascular (ver tabla 3 en material y métodos).

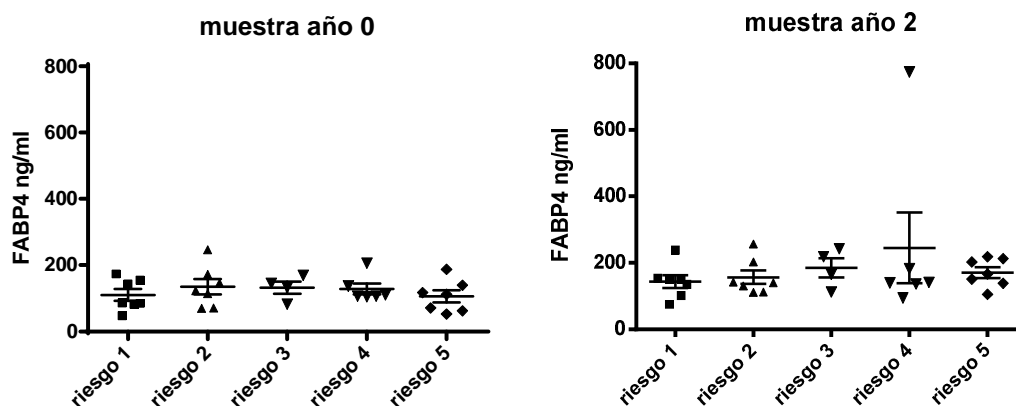


Figura 71: Evaluación de la concentración de FABP4 en el suero de pacientes al inicio (muestra año 0) y trascurridos 2 años desde el comienzo de la DP y divididos en grupos sin enfermedad cardiovascular previa (riesgo 1) o con antecedentes relacionados con la enfermedad vascular de menor a mayor gravedad (riesgo 5). La concentración de FABP4 en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test de Kruskal-Wallis para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes con riesgo cardiovascular 1 ($n = 7$), riesgo 2 ($n = 7$), riesgo 3 ($n=4$), riesgo 4 ($n=6$), riesgo 5 ($n=7$) tanto en la muestra a tiempo 0 como trascurridos 2 años de la diálisis peritoneal. No se encontraron diferencias significativas.

Como se puede apreciar en la Figura 71, la concentración de FABP4 en el suero al inicio de la diálisis, no cambió significativamente en función del menor o mayor riesgo cardiovascular que tuvieran los pacientes; aunque la concentración de FABP4 encontrada en el suero de pacientes tras 2 años en DP fue siempre mayor que al inicio de la misma, independientemente de los antecedentes clínicos. En este caso las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas en los pacientes con riesgo cardiovascular, siendo las diferencias más acusadas en pacientes con riesgo 5 (Figura 72).

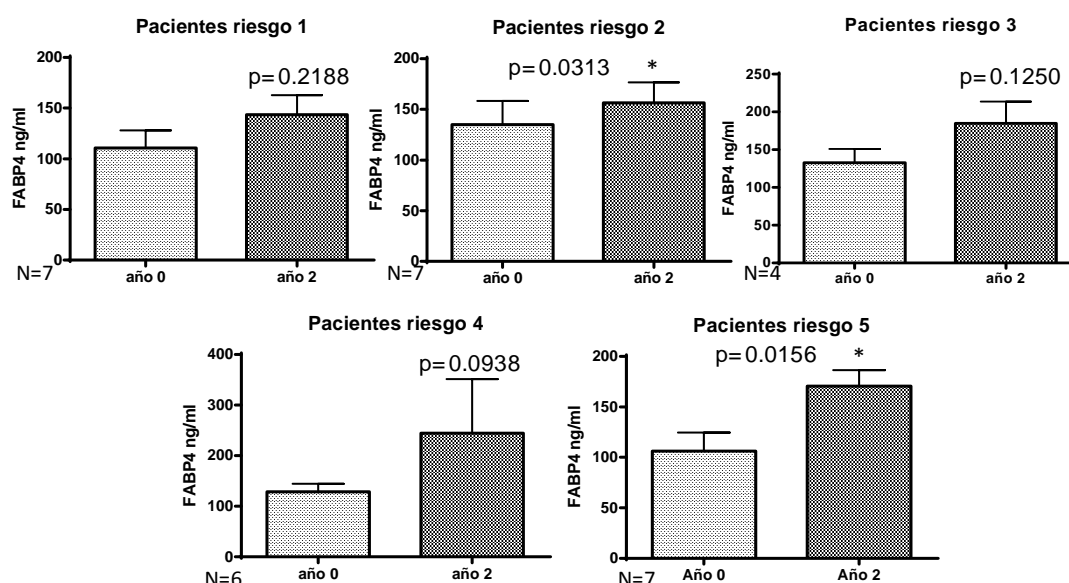


Figura 72: Evaluación de la concentración de FABP4 en el suero de pacientes con riesgo cardiovascular al inicio (muestra año 0) y trascurridos 2 años desde el comienzo de la DP.

Se dividieron los pacientes en grupos sin enfermedad cardiovascular previa (riesgo 1) o con antecedentes relacionados con la enfermedad vascular de menor a mayor gravedad (riesgo 5). La concentración de FABP4 en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test de Wilcoxon para datos pareados para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes con riesgo cardiovascular 1, riesgo 2, riesgo 3, riesgo 4, riesgo 5 tanto en la muestra a tiempo 0 como transcurridos 2 años de la diálisis peritoneal.

4.2 Análisis de la relación de FABP4 con las distintas variables clínicas de los pacientes estudiados

A) FABP4 y Diabetes

FABP4 se ha implicado en la patología de muchas enfermedades, incluyendo la diabetes en los seres humanos, pero aún no ha sido objeto de aplicaciones terapéuticas (Burak et al., 2015).

Como observamos en la figura 73, no encontramos diferencias significativas en la concentración sérica de FABP4 entre los pacientes diabéticos y los que no lo eran independientemente del tiempo que llevaran en DP. Al comparar entre los distintos tipos de diabetes, diabetes mellitus tipo 1 o diabetes insulino-dependiente (DM1) y diabetes mellitus tipo 2 o diabetes no insulino-dependiente (DM2) observamos que en los dos tipos de diabetes la concentración sérica de FABP4 estaba aumentada en los pacientes que llevaban 2 años en DP en comparación con los pacientes de inicio y las diferencias eran estadísticamente significativa en los pacientes con diabetes tipo 2 (Figura 73 C).

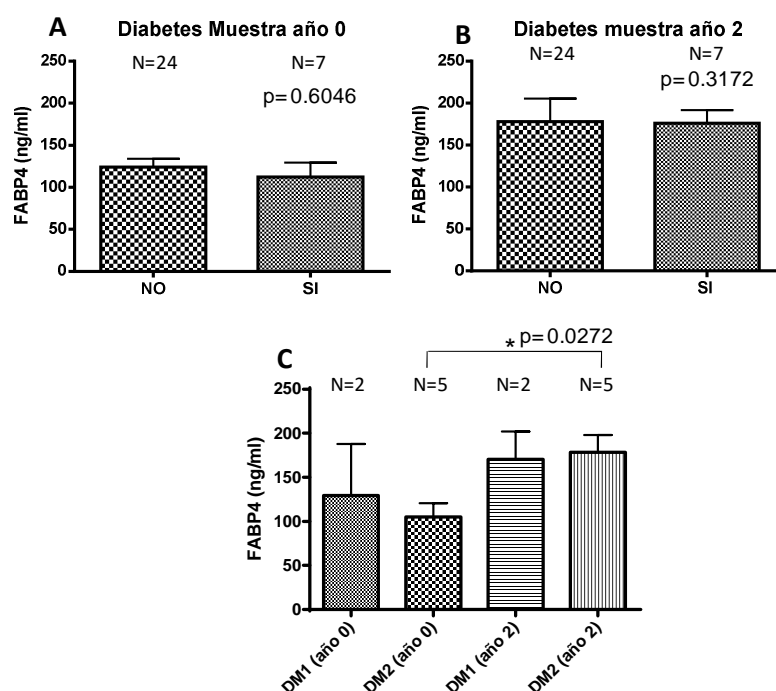


Figura 73: Evaluación de la concentración de FABP4 en el suero de pacientes con diabetes al inicio (muestra año 0) y transcurridos 2 años desde el comienzo de la DP.

La concentración de FABP4 en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test de Mann-Whitney para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes diabéticos ($n=7$) y sin diabetes ($n=24$) tanto en la muestra a tiempo 0 como transcurridos 2 años de la diálisis peritoneal. Además se utilizó el test de Student pareado para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes con DM2 tanto en la muestra a tiempo 0 como transcurridos 2 años de la diálisis peritoneal DM2(año0) vs DM2(año2) * $p < 0,05$.

B) FABP4 y enfermedad cardiovascular (ECV)

Varios estudios han demostrado que las concentraciones séricas de FABP4 aumentaban en pacientes con enfermedades cardiovasculares (ECV) (Queipo-Ortuno et al., 2012, Cabre et al., 2008).

En nuestro estudio encontramos que tras 2 años en DP la concentración sérica de FABP4 se encontraba aumentada de forma estadísticamente significativa en los pacientes que sufrían ECV en comparación con los pacientes que no tenían ECV diagnosticada antes de iniciar la diálisis (Figura 74). En las muestras de inicio se observó un ligero aumento no significativo de los niveles de FABP4 circulante en los pacientes con ECV. Sin embargo las diferencias en los niveles séricos de FABP4 fueron significativamente mayores en pacientes con ECV tras dos años en DP.

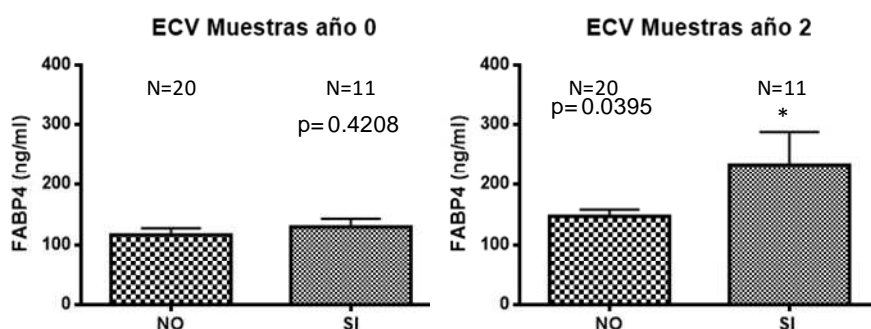


Figura 74: Evaluación de la concentración de FABP4 en el suero de pacientes con ECV al inicio (muestra año 0) y transcurridos 2 años desde el comienzo de la DP. La concentración de FABP4 en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test de Mann Whitney para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes con enfermedad vascular ($n=11$) y sin enfermedad cardiovascular ($n=20$) tanto en la muestra a tiempo 0 como transcurridos 2 años de la diálisis peritoneal.

También comparamos la concentración sérica de FABP4 en pacientes con enfermedad vascular periférica, también conocida como enfermedad arterial periférica, que acontece como consecuencia de la obstrucción de grandes arterias causa de la aterosclerosis. Pacientes con aterosclerosis tenían mayores concentraciones de FABP4 en suero pero en nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de FABP4

circulante entre los pacientes con y sin enfermedad vascular periférica a tiempo 0 o tras 2 años en diálisis peritoneal (datos no mostrados).

C) FABP4 y obesidad

El aumento de FABP4 está estrechamente relacionado con el desarrollo de la obesidad y el síndrome metabólico (Xu et al., 2006).

Nuestros resultados mostraron una leve disminución de la concentración de FABP4 en pacientes con obesidad en comparación con pacientes sin sobrepeso tanto al inicio como tras 2 años en DP; aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 75).

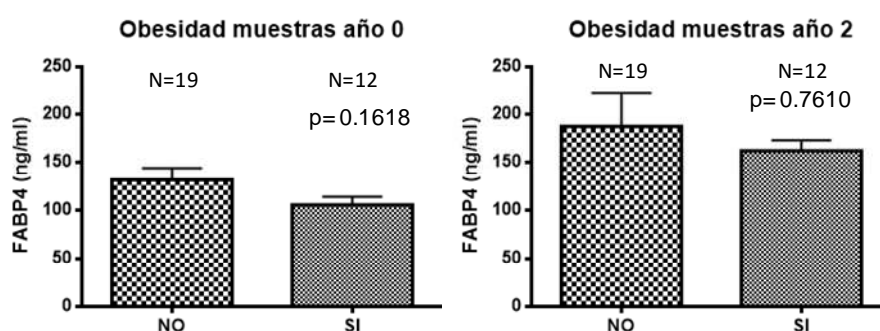


Figura 75: Evaluación de la concentración de FABP4 en el suero de pacientes obesos al inicio (muestra año 0) y trascurridos 2 años desde el comienzo de la DP. La concentración de FABP4 en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test de Mann Whitney para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes con obesidad (n= 12) y sin obesidad (n=19) tanto en la muestra a tiempo 0 como trascurridos 2 años de la diálisis peritoneal.

D) FABP4 y Dislipidemia

Las dislipidemias o dislipemias son una serie de diversas condiciones patológicas cuyo único elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos y su consecuente alteración del metabolismo lipídico en sangre. Las concentraciones plasmáticas de FABP4 aumentadas parecen ser un biomarcador clínico y se le supone un gran potencial para la predicción del desarrollo de la dislipidemia aterogénica (Cabre et al., 2008).

Como se observa en la figura 76, la concentración de FABP4 aumentó en pacientes con dislipidemia tras 2 años en DP mientras que no encontramos diferencias en el caso de pacientes que no habían empezado con la diálisis.

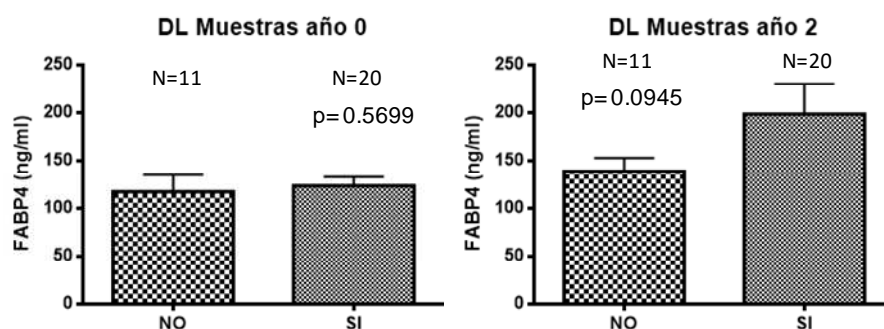


Figura 76: Evaluación de la concentración de FABP4 en el suero de pacientes con dislipidemia al inicio (muestra año 0) y transcurridos 2 años desde el comienzo de la DP. La concentración de FABP4 en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test de Mann-Whitney para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes con dislipidemia (n= 20) y sin dislipidemia (n=11) tanto en la muestra a tiempo 0 como transcurridos 2 años de la diálisis peritoneal.

4.3 Análisis de la relación de FABP4 con las distintas citoquinas estudiadas

A) Correlación entre FABP4 y CCL18

Dependiendo del microambiente y la concentración local de diversas citoquinas, los macrófagos pueden adoptar un fenotipo proinflamatorio (M1) o pro-fibrótico (M2) caracterizado este último por la expresión de CD206 y CD163 en la superficie celular y la producción de factores solubles tales como la quimioquina CCL18 (Kodelja et al., 1998, Martinez et al., 2008).

En un trabajo reciente de nuestro grupo, se estudió la población de macrófagos peritoneales en pacientes en DP. Este modelo el estrés continuo debido a los líquidos de diálisis y las recurrentes peritonitis provocó la infiltración de macrófagos con fenotipo M2. Estos macrófagos M2 a través de la secreción de factores fibrogénicos contribuyen al desarrollo de la fibrosis peritoneal. Entre estos factores, encontramos una elevada producción de CCL18 por macrófagos peritoneales y concentraciones elevadas de CCL18 en el efluente peritoneal en pacientes con fallo de membrana y con posterior desarrollo de peritonitis esclerosante encapsulante (Bellon et al., 2011).

Algunos autores han descrito la expresión de CCL18 en placas de ateroma (Hagg et al., 2009) y se ha sugerido que niveles elevados de CCL18 circulante en suero podrían ser un factor predictor de enfermedad cardiovascular grave (de Jager et al., 2012). Nos propusimos por

tanto analizar si niveles elevados de CCL18 circulante podrían estar relacionados con el riesgo cardiovascular en pacientes en DP.

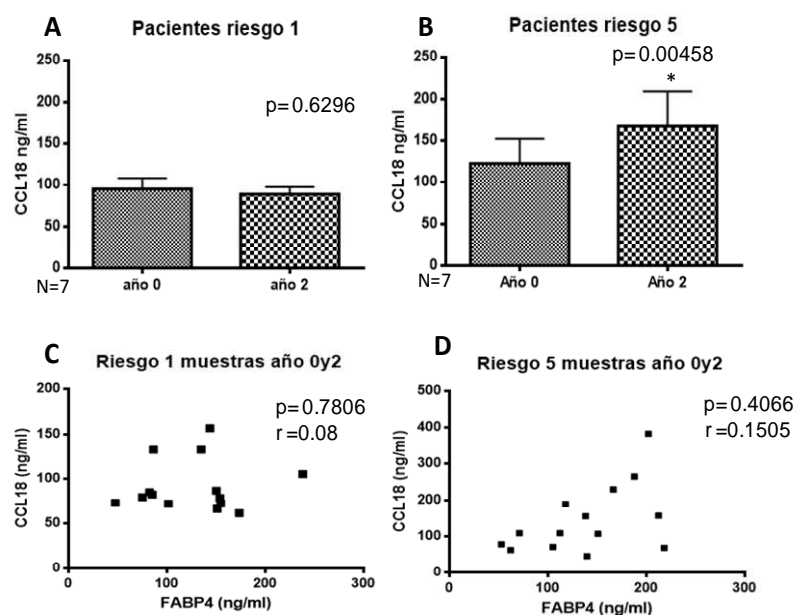


Figura 77: Evaluación de la concentración de CCL18 en el suero de pacientes al inicio (muestra año 0) y transcurridos 2 años desde el comienzo de la DP y divididos en grupos sin enfermedad cardiovascular previa (riesgo 1) o con antecedentes relacionados con la enfermedad vascular de mayor gravedad (riesgo 5). La concentración de CCL18 en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test t de Student (pareado) para examinar las diferencias en los niveles de FABP4 entre los pacientes con riesgo cardiovascular 1 ($n = 7$) y riesgo 5 ($n=7$) tanto en la muestra a tiempo 0 como transcurridos 2 años de la diálisis peritoneal (A,B). Se realizaron correlaciones entre las concentraciones séricas de FABP4 y CCL18 de los pacientes con riesgo cardiovascular 1 (correlación de Pearson) (C) y pacientes con riesgo cardiovascular 5 (correlación de Spearman) (D).

La concentración de CCL18 en el suero de pacientes sin antecedentes cardiovasculares (riesgo 1) disminuyó ligeramente transcurridos 2 años desde el inicio de la diálisis mientras que en pacientes con mayores problemas vasculares (riesgo 5) la concentración de CCL18 aumentó de forma estadísticamente significativa tras 2 años en diálisis (Figura 77 A,B). Analizamos la relación entre la concentración de FABP4 y CCL18 mediante el análisis de correlaciones de tipo lineal y como se observa en la Figura 77 C y D, sólo se correlacionaron levemente los niveles séricos de FABP4 y CCL18 en los pacientes con mayor riesgo cardiovascular. Las dos variables aumentaron en los pacientes con mayores problemas cardiovasculares; aunque no encontramos una correlación estadísticamente significativa entre ambas. En cambio, no existió ninguna correlación entre FABP4 y CCL18 si comparamos entre los distintos tiempos en diálisis de todos los pacientes (datos no mostrados).

B) Correlación entre FABP4 y Leptina

En los pacientes con enfermedad renal terminal (ESRD), adipoquinas como la leptina se acumulan en el plasma debido principalmente a la pérdida de su aclaramiento renal. Los niveles séricos de leptina también son mayores en los pacientes que se someten a diálisis peritoneal en comparación con los individuos con la función renal normal (Teta et al., 2008, Jiang et al., 2015, Golembiewska et al., 2013).

Existen trabajos que relacionan la implicación de FABP4 y leptina en la progresión de la aterosclerosis y la ruptura de las placas de ateroma (Lee et al., 2013).

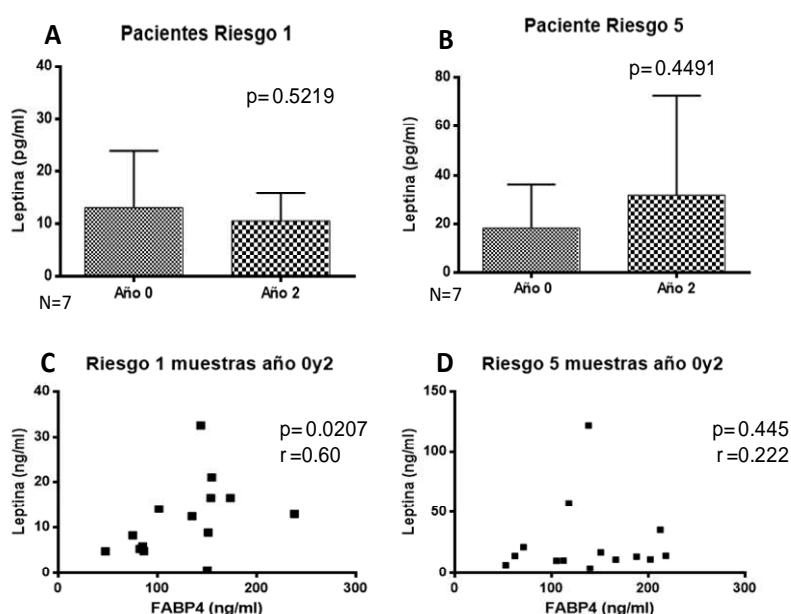


Figura 78: Evaluación de la concentración de leptina en el suero de pacientes a tiempo 0 y trascurridos 2 años desde el inicio de la diálisis y divididos en grupos sin enfermedad cardiovascular previa (riesgo 1) o con antecedentes relacionados con la enfermedad vascular de mayor gravedad (riesgo 5). La concentración de leptina en suero se evaluó mediante ELISA. Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar y se utilizó el test t de Student (pareado) para examinar las diferencias en los niveles de leptina entre los pacientes con riesgo cardiovascular 1 ($n = 7$) y riesgo 5 ($n=7$) tanto en la muestra a tiempo 0 como trascurridos 2 años de la diálisis peritoneal (A,B). Se realizaron correlaciones entre las concentraciones séricas de FABP4 y leptina de los pacientes con riesgo cardiovascular 1 (correlación de Spearman) (C) y pacientes con riesgo cardiovascular 5 (correlación de Spearman) (D).

La concentración de leptina en el suero de pacientes sin antecedentes cardiovasculares (riesgo 1) disminuyó ligeramente trascurridos 2 años desde el inicio de la diálisis mientras que en pacientes con mayores problemas vasculares (riesgo 5) la concentración de leptina aumentó aunque no de forma estadísticamente significativa tras 2 años en diálisis (Figura 78 A,B). Además, observamos que los niveles de leptina tanto a tiempo 0 como después de 2 años en

diálisis fueron menores en pacientes sin antecedentes cardiovasculares en comparación con pacientes con problemas cardiovasculares.

Analizamos la relación entre la concentración de FABP4 y leptina mediante el análisis de correlaciones de tipo lineal y como se observó en la Figura 78 C,D existió una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de FABP4 y leptina en pacientes sin antecedentes cardiovasculares. La relación entre las dos variables en el caso de pacientes con riesgo vascular fue mucho menor y no fue estadísticamente significativa.

Discusión

1. Búsqueda de ligandos de FABP4

Hoy en día hay un gran interés en relación con la inflamación como el objetivo directo para intervenciones farmacológicas dirigidas a prevenir o tratar la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, o modular el riesgo de la enfermedad cardiovascular y otras enfermedades metabólicas. No cabe duda que haber demostrado que TNF- α induce resistencia a la insulina fue un gran paso en vincular la inflamación a la patogénesis más importante que predispone a la DM2 (Cottam et al., 2004). Se propone el TNF- α como la citoquina más importante en la patogénesis de trastornos inflamatorios inmunes (Kuek et al., 2007), incluyendo las enfermedades autoinmunes, la resistencia a la insulina y el cáncer.

Los monocitos y macrófagos son los principales productores de TNF- α . En casos de obesidad aumenta el número y tamaño de los adipocitos y se induce la acumulación de macrófagos. Estos macrófagos producen muchas de las moléculas inflamatorias secretadas por el tejido adiposo como TNF- α (Kawai and Akira, 2007) que contribuye a la resistencia a la insulina y crea un estado de inflamación crónica de baja intensidad. Los macrófagos en el tejido adiposo definitivamente contribuyen a la producción de mediadores inflamatorios en cooperación con los adipocitos, lo que sugiere una potencial e importante influencia de dichos macrófagos en promover resistencia a la insulina.

Actualmente, los agentes antiinflamatorios esteroideos (hormonas) y no esteroideos (AINES) se utilizan para el tratamiento de diversas patologías. Más concretamente los AINES son inhibidores de la enzima ciclooxigenasa (COX) que es la encargada de la síntesis de prostaglandinas (Ortega et al., 2014) mientras que en el caso de los corticoides es más complejo aunque parece que hay estudios que sugieren que inhiben distintas citoquinas como IL-12 en células dendríticas (Li et al., 2015). Sin embargo, estos agentes tienen diversos puntos de acción y no tienen una acción inhibitoria específica para TNF- α . Así, es probable que provoquen efectos secundarios perjudiciales, particularmente, los efectos secundarios de los antiinflamatorios esteroideos (corticoides) se han convertido en un problema médico (Buttgereit et al., 2016).

Los anti-TNF- α son probablemente los fármacos biológicos de más éxito hoy en día y están indicados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide crónica, artritis psoriásica, artritis idiopática autoinmune, psoriasis, espondilitis anquilosante, enfermedad Crohn y colitis ulcerosa, en las que han demostrado buenos resultados clínicos (Kohm et al., 2015); pero tienen efectos secundarios como reacciones de hipersensibilidad, predisposición a infecciones que pueden ser graves como tuberculosis y

sepsis, aumento del riesgo de desarrollo de tumores y el deterioro neuronal ocasionado por un efecto desmielinizante.

Además, aunque los anticuerpos sintéticos tales como etanercept, infliximab y adalimumab han sido aprobados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias por inhibición directa de TNF- α , el bloqueo de la función o de la producción de TNF- α mediante el tratamiento con una molécula pequeña puede llegar a ser una solución alternativa muy eficaz (Hsu et al., 2014). Por tanto actualmente se ha vuelto a prestar mucha atención a nuevas estrategias encaminadas a desarrollar una nueva generación de inhibidores de TNF- α ya que un bloqueo bioquímico, farmacológico o genético de las acciones del TNF- α , incrementa la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos (Uysal et al., 1997) y podría ser una estrategia eficaz para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Estos inhibidores permiten una administración por vía oral y presentan pocos efectos secundarios.

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) son muy importantes en el metabolismo lipídico. Estudios preliminares tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran la importancia de las FABPs ya que su ausencia provoca graves alteraciones metabólicas (Makowski and Hotamisligil, 2005).

En concreto FABP4/ap2 o FABP del adipocito, es la más conocida. Se expresa tanto en adipocitos como en macrófagos y coordina respuestas metabólicas e inflamatorias (Hotamisligil et al., 1996, Uysal et al., 2000, Furuhashi et al., 2008). Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que FABP4 (aP2) puede ser una buena diana terapéutica contra enfermedades como la diabetes tipo 2 y la aterosclerosis. Estudios en ratones deficientes en FABP4 (aP2^{-/-}) demuestran que esta proteína tiene un importante papel en el síndrome metabólico ya que la inhibición de FABP4 protege al ratón de sufrir aterosclerosis y otros eventos inflamatorios.

Los laboratorios Bristol-Myers han desarrollado un inhibidor químico de FABP4 (BMS309403) que mejora el metabolismo de la glucosa y suprime la infiltración grasa en el hígado en un modelo de ratón. A nivel funcional este compuesto produce disminución significativa de la concentración de la citoquina proinflamatoria TNF- α secretada por la línea celular THP-1 (Furuhashi et al., 2007). Por lo tanto agentes farmacológicos que modifican la función proinflamatoria de FABP4 pueden ser una oportunidad terapéutica para muchos componentes del síndrome metabólico.

Lehmann y colaboradores desarrollaron un inhibidor selectivo de FABP4, el ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico, en base a su capacidad de desplazar su ligando natural, el ácido linoleico (Lehmann et al., 2004). Demostraron así la especificidad de la unión a FABP4 frente a otras FABPs pero no realizaron ningún ensayo funcional para determinar si actúa como agonista o antagonista de FABP4.

En base a todo lo descrito, nos planteamos que distintos compuestos derivados del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico serían inhibidores de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α a través de la unión con FABP4, bloqueando las rutas proinflamatorias en la línea celular THP-1 y en células primarias como monocitos/macrófagos y adipocitos. En caso de obtener resultados positivos estos compuestos podrían ser la base de fármacos utilizados para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares en condiciones de inflamación.

Por ello, en un primer momento, evaluamos la capacidad del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (PSA-3-49) y distintas moléculas derivadas del mismo como posibles inhibidores de FABP4 (aP2) para disminuir la producción de TNF- α estimulada por LPS en la línea pro-monocítica humana THP-1 y células primarias (monocitos, DCs y adipocitos).

Nuestros resultados sugieren que PSA-3-49 no afecta la producción de TNF- α en células THP-1 por lo que podríamos decir que es ligando pero no inhibidor de la función proinflamatoria descrita para FABP4 fundamentalmente en el modelo de ratón o en líneas celulares como THP-1 o 3T3-L1. Por lo tanto, modificando la estructura molecular del compuesto de referencia PSA-3-49 podríamos encontrar algún compuesto que fuera un inhibidor de la producción de TNF- α .

En una primera fase, estudiamos un total de 13 compuestos que representan distintas modificaciones del compuesto original PSA-3-49 y que podemos agrupar en la familia de compuestos PSA. Descartada la toxicidad de los compuestos, seleccionamos además del compuesto de referencia PSA-3-49 dos compuestos derivados, el PSA-3-64 y el PSA-3-65. Estos compuestos parecen ser los mejores inhibidores de la respuesta en los distintos tipos celulares estudiados aunque ninguno de ellos superó el 50% de porcentaje de inhibición de TNF- α ni disminuyó la concentración de TNF- α en el sobrenadante de cultivo de forma estadísticamente significativa. Además comprobamos que el incremento de expresión de FABP4 al diferenciar la línea THP-1 con PMA no modifica la regulación de la producción de TNF- α por los compuestos seleccionados por lo que los ensayos se realizaron con las células sin diferenciar ya que facilitaba y simplificaba el bioensayo.

En una segunda fase, estudiamos 22 compuestos que conservan la estructura madre del compuesto de referencia (PSA-3-49), añadiendo anillos benzídicos y que diferenciamos en dos familias distintas (EMB-9) y (EMB-12). En esta ocasión, aunque el tratamiento con LPS no afectó a la viabilidad celular de los cultivos, algunos de los compuestos resultaron tóxicos a las concentraciones más altas por lo que disminuimos las concentraciones en el bioensayo.

Estudiamos la capacidad de los diversos compuestos para modular la producción de TNF- α inicialmente en células THP-1 y con una sola dosis a 10 μ M. Realizamos otros experimentos con concentraciones crecientes sólo en aquellos compuestos que mostraban baja toxicidad.

Seleccionamos los compuestos EMB-9, EBM 82b y EMB-12 ya que no afectaron a la viabilidad celular e inhibieron la producción de TNF- α en la línea THP-1 y los compuestos EBM T78d, EBM T59 y EBM 011 que, aunque presentaban mayor toxicidad a concentraciones superiores a 10 μ M mostraron una mayor capacidad de inhibición de TNF- α a concentraciones inferiores.

Calculamos el porcentaje de inhibición de la producción de TNF- α (Tabla 5) por los distintos compuestos y seleccionamos el compuesto EBM T78d como el mejor inhibidor ya que el pre-tratamiento con el mismo originó una inhibición estadísticamente significativa de la producción de TNF- α dependiente de dosis. Este compuesto inhibe de forma muy eficiente la secreción de TNF- α a concentraciones muy bajas.

La concentración inhibitoria media (IC₅₀) es una medida de la eficacia de una sustancia en la inhibición de una función biológica específica, en nuestro caso el compuesto con menor IC₅₀ es EBM T78d (IC₅₀ = 4,49 μ M en THP-1) por lo que a bajas dosis presentó una mayor inhibición de la producción de TNF- α que los demás compuestos.

Quisimos profundizar más en los efectos del compuesto EBM T78d seleccionado como el mejor inhibidor de TNF- α y comprobar si era ligando de FABP4.

Se ha descrito que la localización de FABP4 es citoplasmática y se transloca al núcleo en presencia de ligandos de PPAR γ (Tan et al., 2002), sin embargo nuestros resultados no fueron concluyentes al analizar la localización citoplasmática de la proteína de fusión FABP4-GFP en células COS-7 o pre-adipocitos.

Para averiguar si los efectos sobre la producción de TNF- α de los compuestos seleccionados (PSA-3-49, PSA-3-64, PSA-3-65 y EBM T78d) se debían a un efecto directo sobre la proteína FABP4, desarrollamos ensayos de fluorescencia para identificar cuáles de ellos serían ligandos de FABP4. En estos experimentos el compuesto PSA-3-49 fué el mejor ligando de FABP4 (IC₅₀= 0,274 μ M) de todos los estudiados incluso con mayor afinidad que los ligandos naturales de FABP4 (ácidos grasos oleico o araquidónico), resultado que se corresponde con lo ya publicado (Lehmann et al., 2004). Por el contrario, EBM T78d no mostró afinidad por la proteína y no pudimos calcular una IC₅₀ para este compuesto debido a su auto-fluorescencia basal. El compuesto PSA-3-65 podría ser un ligando de FABP4 pero su afinidad por la proteína resultó ser menor a la de los ligandos naturales.

2. Análisis del efecto del compuesto PSA-3-49

Nos pareció muy interesante ahondar en los efectos funcionales sobre la respuesta inflamatoria de los compuestos seleccionados de la familia PSA (PSA-3-64 y PSA-3-65) y del compuesto de referencia PSA-3-49, ligando de FABP4. Dada la importancia de la IL-6 en enfermedades inflamatorias y metabólicas (Fried et al., 1998) estudiamos sus efectos sobre la producción de esta citoquina. Los compuestos PSA-3-49 y PSA-3-65 inhibieron la producción de IL-6 en respuesta a LPS en monocitos CD14+ aunque no de forma dependiente de dosis. En cambio, el pre-tratamiento con los compuestos no inhibió la producción de IL-6 en células madre mesenquimales y adipocitos maduros.

Trabajos anteriores demostraron que la inhibición de FABP4/aP2 mejoraba el fenotipo diabético de ratones obesos mientras que al aumentar la concentración sérica de FABP4 aumentaría la resistencia a la insulina (Cao et al., 2013), por lo que desarrollamos un modelo experimental donde analizamos si el tratamiento con PSA-3-49 podría alterar la liberación de FABP4 soluble por adipocitos utilizando explantes de omento humano. En estos ensayos el pretratamiento con el compuesto disminuyó la liberación de FABP4 soluble al medio.

Además FABP4 soluble aumentó la fosforilación de AKT inducida por insulina en la línea de hepatocitos humana Hepa y el tratamiento con el compuesto PSA-3-49 disminuyó este efecto de forma dependiente de dosis.

Para comprobar que los datos eran reproducibles, utilizamos otro sistema experimental y empleamos medio condicionado de la línea 3T3-L1 diferenciada a adipocitos como fuente de FABP4 soluble. Este medio condicionado añadido a a las células Hepa aumentó la fosforilación de AKT inducida por insulina de forma similar al medio condicionado procedente de los explantes de omento humano y la adición del compuesto PSA-3-49 disminuyó este efecto de forma dependiente de dosis.

En ausencia de medio condicionado distintas concentraciones del compuesto no tuvieron ningún efecto sobre la fosforilación de AKT inducida por insulina, lo que apoya que los efectos del mismo se ejercen sobre FABP4.

Por lo tanto, comprobamos que el compuesto previamente descrito PSA-3-49 es un muy buen ligando de FABP4; pero por el contrario no es un compuesto anti-inflamatorio demasiado eficaz según las citoquinas estudiadas en el sobrenadante de distintos tipos celulares.

Se ha descrito que la señalización inducida por la insulina y p-AKT activan genes responsables de inducir lipogénesis en adipocitos y una lipogénesis muy activa puede contribuir a la esteatosis hepática que puede conducir y está muy relacionado con obesidad y resistencia a la

insulina. Las relaciones entre lipogénesis y la esteatosis son complejas y actualmente no se entienden a nivel molecular (Wang et al., 2015).

Nos resultó complicado desarrollar un sistema experimental para profundizar en los efectos metabólicos de este compuesto; pero nuestros resultados, junto con los previamente publicados (Cao et al., 2013) en los que se utiliza un anticuerpo monoclonal para bloquear los efectos de FABP4 soluble en un modelo de ratón, sugieren que el tratamiento con PSA-3-49 podría tener efectos potencialmente terapéuticos disminuyendo la liberación FABP4 soluble en tejido adiposo humano y el aumento de la fosforilación de AKT en hepatocitos mediado por la proteína FABP4 soluble (Figura 79).

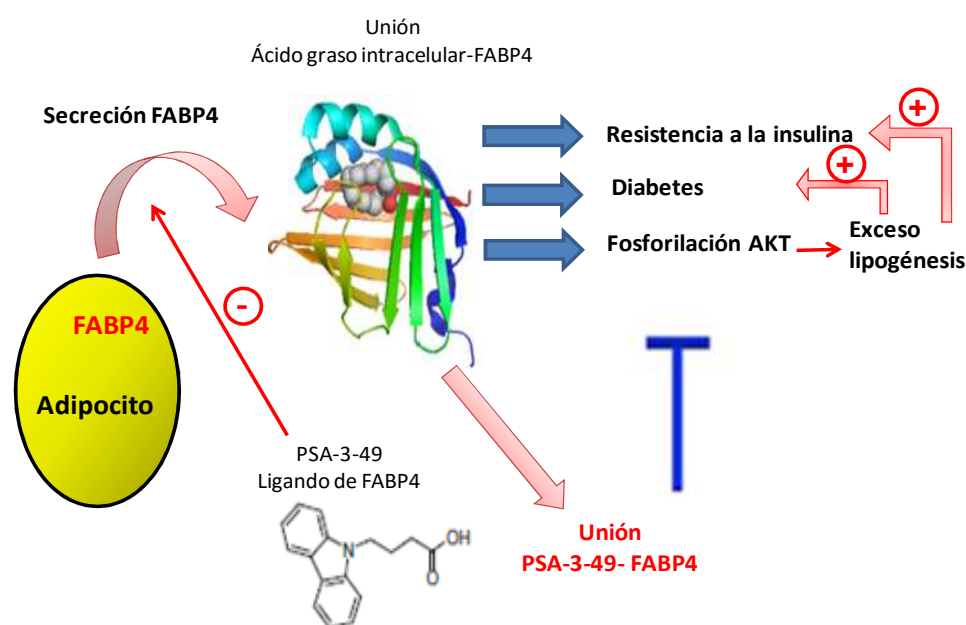


Figura 79: Acciones de la secreción de FABP4 por los adipocitos. FABP4 es secretada por los adipocitos y puede contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina, diabetes mellitus, aterosclerosis, hipertensión, y disfunción cardíaca, que conduce a un mal pronóstico de muerte cardiovascular. La inhibición o neutralización de FABP4 secretada por el ligando PSA-3-49 puede representar una estrategia terapéutica eficaz contra las enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

3. Análisis del compuesto EBM T78d como potencial agente inflamatorio

También quisimos profundizar en las propiedades del compuesto EBM T78d que aunque no resultó ser un buen ligando de FABP4, si disminuyó la producción de TNF- α por las células THP-1 dependiente de dosis por lo que podría ser un buen agente anti-inflamatorio. Siguiendo el mismo protocolo experimental, obtuvimos que el tratamiento con el compuesto EBM T78d y la

posterior estimulación con LPS inhibió la secreción de TNF- α tanto en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) como en monocitos aislados de forma dependiente de dosis y estadísticamente significativa a 2,5 μ M. Calculamos la IC₅₀ del compuesto EBM T78d en PBMCs (2,65 μ M) y en Monocitos (2,01 μ M) siendo superior en PBMCs debido probablemente a la contribución de otros tipos celulares. Además el pre-tratamiento con el compuesto disminuyó la concentración de TNF- α en macrófagos de médula ósea de ratón en respuesta a LPS.

Asimismo, el tratamiento con el compuesto inhibió la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8 e IL-6 de forma dependiente de dosis en células THP-1, así como la producción de las citoquinas IL-6 e IL-10 en monocitos primarios tras la estimulación con LPS.

Hasta ahora habíamos estudiado la respuesta a LPS, que actúa a través del receptor TLR4. Quisimos evaluar también si el compuesto EBM T78d podría inhibir la producción de citoquinas tras la estimulación a través de otros TLRs como el TLR3 utilizando poly I:C, un análogo sintético de ssRNA que también es capaz de estimular la respuesta inflamatoria en monocitos, macrófagos y células dendríticas. El compuesto EBM T78d fue capaz de inhibir la producción de TNF- α en monocitos y células dendríticas estimuladas con poly I:C.

Además el compuesto EBM T78d también fue capaz de inhibir la producción de la quimioquina MCP-1 en respuesta a la posterior estimulación con poly I:C en monocitos y de MCP-1 e IL-12 en células dendríticas.

Estudiamos el efecto del compuesto EBM T78d en macrófagos polarizados in vitro a M2 mediante tratamiento con IL-4. El compuesto no alteró la producción de CCL18 en monocitos plenamente diferenciados a M2 tras el tratamiento durante 5 días con IL-4; pero sí inhibió la producción de CCL18 en monocitos tratados durante 48h con IL-4.

En obesidad el adipocito incrementa la expresión de TLR2, TLR4 y TLR 9. La procedencia del LPS está relacionada con la hiperinsulinemia presente en el síndrome metabólico, que produce deficiencias en el sistema inmune, razón por la cual el LPS producido por bacterias intestinales no puede ser eliminado, permitiendo que entre a la circulación y llegue al tejido adiposo, donde produce inflamación crónica (Creely et al., 2007). La inhibición de genes proinflamatorios en el tejido adiposo mejoraría la acción de la insulina y podría ser una estrategia terapéutica (Aouadi et al., 2013). El compuesto EBM T78d podría ser efectivo en este contexto, ya que el pretratamiento con el mismo no sólo inhibió la respuesta inflamatoria en células del sistema inmune, sino que también comprobamos que se inhibió la producción de IL-6 y leptina de forma dosis dependiente en adipocitos y la producción de IL-6 en células madre mesenquimales estimuladas con LPS.

Otro punto para explorar las capacidades del compuesto EBM T78d fué analizar sus efectos a nivel transcripcional. Comprobamos que el tratamiento con el compuesto a dosis muy bajas (1 μ M) disminuyó la expresión del ARNm de TNF- α en células THP-1, PBMCs y monocitos estimulados con LPS. También disminuyó la expresión de IL-6 e IL-8 en monocitos estimulados con LPS. Además, inhibió la expresión de IL-6 en células mesenquimales pero no en adipocitos diferenciados *in vitro*; aunque sí inhibió la producción de proteína en un único experimento realizado.

NF- κ B es un factor de transcripción fundamental en la señalización a través de TLR4 y TNF- α en la respuesta inflamatoria(Oeckinghaus et al., 2011, Ghosh et al., 2012). La molécula EBM T78d bloqueó la actividad del factor de transcripción NF- κ B y disminuyó la fosforilación de JNK a dosis bajas por lo que parece que el compuesto regularía varios factores implicados en esta vía de señalización inflamatoria.

En el contexto del síndrome metabólico, es de reseñar que en adipocitos maduros el compuesto inhibió también la expresión de FABP4 en respuesta a LPS, puesto que se ha descrito que FABP4 activa JNK (Hui et al., 2010), este compuesto podría ejercer también efectos indirectos sobre la expresión de genes regulados a través de esta vía en adipocitos (Figura 80). Es por ello que el compuesto EBM T78d pudiera ser de interés terapéutico no solo en enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune, sino también en la enfermedad metabólica.

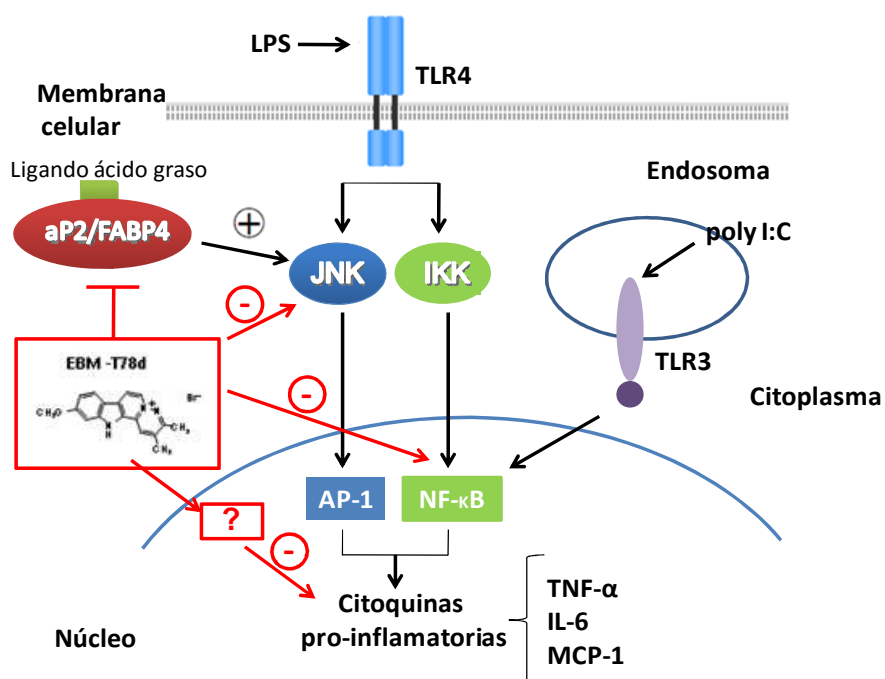


Figura 80: Resumen de las acciones del compuesto EBM T78d

Dado que el compuesto EBM T78d inhibe la producción de TNF- α y otras citoquinas y quimioquinas en distintos tipos celulares a concentraciones bajas, que podrían ser dosis terapéuticas, nos planteamos analizar sus efectos en un modelo experimental en ratón. En un experimento preliminar comprobamos que no resulta tóxico en ratones. La administración intraperitoneal del compuesto disminuyó la producción de TNF- α e IL-6 en el peritoneo en respuesta a LPS. Dosis más elevadas del compuesto (40 μ g/ratón) provocaron una inhibición de la producción de IL-6 y MCP-1 en respuesta a LPS *in vivo* que se objetivó en el sobrenadante de las células peritoneales de los animales cultivadas *ex vivo* en ausencia de estímulo adicional. La administración del compuesto disminuyó también la concentración de MCP-1 circulante en el suero de los ratones aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por último aislamos esplenocitos de ratones control o tratados con el compuesto EBM T78d (40 μ g/ratón) y comprobamos que la liberación de TNF- α en respuesta a LPS se redujo significativamente en los esplenocitos de los ratones tratados en comparación con el grupo control. Estos datos sugieren que la administración *in vivo* del compuesto EBM T78d es eficaz y capaz de reducir el potencial proinflamatorio de las células inmunes ante un fuerte estímulo como es el LPS.

Concluyendo, varios compuestos mostraron una actividad inhibitoria de la producción de TNF- α . Entre ellos, el compuesto EBM T78d se seleccionó para un estudio adicional y más en profundidad gracias a su baja toxicidad y eficacia a dosis bajas en células THP-1 y monocitos. Además de inhibir la señales inflamatorias a través de TLR4 (LPS), el compuesto disminuyó la producción de citoquinas proinflamatorias en varios tipos celulares en respuesta a poly I:C que estimula el receptor intracelular TLR3 (Rodríguez-Sanz et al., 2015) (PCT/ES2014/070603) (Figura 81).

Por todo ello, el compuesto EBM T78d podría ser un buen agente anti-inflamatorio. Experimentos futuros nos podrían desvelar si el compuesto está implicado en varias rutas o está bloqueando una ruta de señalización diferente a las investigadas.

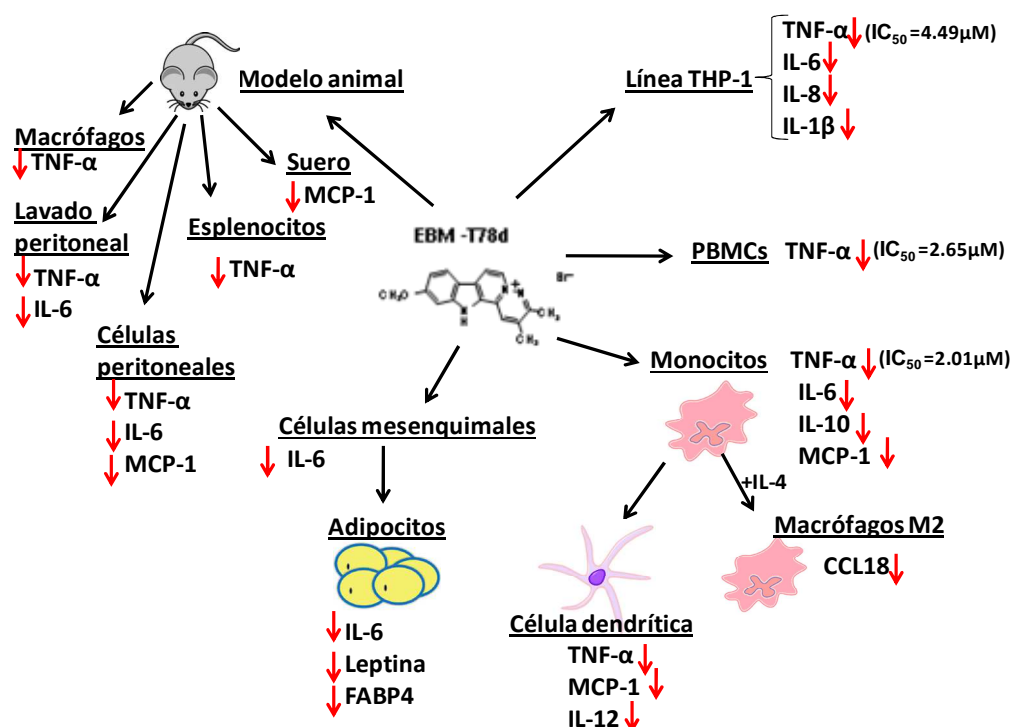


Figura 81: Resumen del efecto del compuesto EBM T78d en la disminución tanto de expresión como de concentración en el sobrenadante de diferentes citoquinas en todos los tipos celulares estudiados.

4. FABP4, diálisis peritoneal y riesgo cardiovascular

La principal causa de mortalidad en los pacientes en diálisis peritoneal es la enfermedad cardiovascular (Lowrie et al., 1973, Li et al., 2013), pero sus verdaderas razones no han sido demostradas.

Diversos trabajos han identificado una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de FABP4, y diversos factores asociados con el riesgo cardiovascular tales como la obesidad, DM2, el aumento del índice de masa corporal (IMC), la resistencia a la insulina y la dislipidemia (Kaess et al., 2012, Furuhashi et al., 2014).

Resultados de varios estudios muestran que los niveles circulantes de varios tipos de FABPs se incrementan en pacientes con disfunción renal (Furuhashi et al., 2004). Se ha demostrado que los niveles de FABP4 en suero están negativamente correlacionados con la tasa de filtración glomerular, lo que indica que las FABPs se eliminan de la circulación principalmente por el aclaramiento renal (Yeung et al., 2009).

Además, el nivel de FABP4 en pacientes sometidos a hemodiálisis es aproximadamente 20 veces mayor que en individuos control con función renal normal y el nivel de FABP4 se reduce en un 57,2% después de la hemodiálisis (Furuhashi et al., 2011a).

En nuestro estudio nos planteamos analizar si existiría una asociación entre la concentración circulante de FABP4 en suero de pacientes en diálisis peritoneal con el mayor o menor riesgo cardiovascular y si podría ser FABP4 un buen marcador predictivo de riesgo cardiovascular en dichos pacientes. Estudiamos las concentraciones circulantes de FABP4 al inicio y tras dos años de tratamiento en una serie de pacientes que subdividimos en 5 grupos según su nivel de riesgo cardiovascular al inicio de la DP. La concentración de FABP4 en el suero tras 2 años en DP fue mayor que al inicio de la diálisis en todos los grupos, independientemente de los antecedentes clínicos. Este aumento fue estadísticamente significativo en los pacientes con mayor riesgo cardiovascular y en pacientes con DM2.

Como hemos dicho anteriormente FABP4 se asocia con la enfermedad cardiovascular (ECV) y aterosclerosis (Queipo-Ortuno et al., 2012). En nuestro estudio la concentración sérica de FABP4 fue similar al inicio de la diálisis en pacientes con o sin ECV previa. Sin embargo, el aumento fue significativamente mayor tras 2 años en DP en los pacientes que sufrían ECV de inicio en relación con el resto de los pacientes.

Otra de las variables clínicas que se han asociado con FABP4 es la dislipidemia ya que el aumento de FABP4 podría ser un biomarcador clínico y predecir el desarrollo de la dislipidemia aterogénica (Cabre et al., 2008). La concentración sérica de FABP4 también aumentó en mayor medida en pacientes con dislipidemia tras 2 años en DP en relación con el resto de pacientes.

Se ha descrito que individuos obesos presentan concentraciones mayores de FABP4 circulante (Kaess et al., 2012), sin embargo nosotros no hemos encontrado un aumento de los niveles de FABP4 en nuestros pacientes obesos independientemente del tiempo en DP. Otros autores (Queipo-Ortuno et al., 2012) encontraron niveles significativamente elevados únicamente en pacientes con IMC >30. En este estudio se descartaban los pacientes con enfermedad renal. En nuestros pacientes con enfermedad renal es posible que niveles elevados de FABP4 en todos los pacientes independientemente del IMC minimice las diferencias entre el grupo de obesos y el de no-obesos.

Analizamos la relación de FABP4 con otras citoquinas estudiadas en estos mismos sueros de pacientes en DP. La DP es un modelo de estrés peritoneal continuo debido a los líquidos de diálisis que provocan una infiltración de macrófagos M2 que son los productores de CCL18 (Bellon et al., 2011), un marcador que podría ser predictor de ECV (de Jager et al., 2012). Además se ha descrito la presencia de M2 y el aumento de FABP4 circulante en tejido adiposo de pacientes obesos con resistencia a insulina (Queipo-Ortuno et al., 2012, Spencer et al., 2010).

En nuestro estudio encontramos que CCL18 podría ser también un predictor o marcador de riesgo cardiovascular en pacientes en diálisis peritoneal ya que aumenta su concentración sérica de forma estadísticamente significativa en pacientes con mayor riesgo cardiovascular cuando llevan 2 años en DP. Además encontramos una cierta correlación entre los niveles séricos de FABP4 y CCL18 en los pacientes con mayor riesgo cardiovascular; aunque no fue estadísticamente significativa.

Varios estudios relacionan FABP4 y leptina en la progresión de la aterosclerosis y la ruptura de las placas de ateroma (Lee et al., 2013). Como ocurre con CCL18, también se apreció un aumento en la concentración sérica de leptina en pacientes con mayor riesgo cardiovascular tras 2 años en DP aunque no hemos podido demostrar que las diferencias fueran estadísticamente significativas. La correlación entre FABP4 y leptina fué estadísticamente significativa en pacientes sin antecedentes cardiovasculares y también existió una correlación entre FABP4 y leptina en pacientes con riesgo cardiovascular; aunque sin significancia estadística.

En resumen, existiría una asociación entre el incremento de la concentración de FABP4 circulante en suero de pacientes que han sido tratados durante varios años con DP, el mayor riesgo cardiovascular y variables clínicas asociadas con el síndrome metabólico. La DP parece ser un factor de riesgo en pacientes con problemas cardiovasculares de inicio y potenciaría el riesgo cardiovascular. El aumento de la concentración sérica de FABP4 en estos pacientes podría ser un marcador de daño o un marcador del incremento de riesgo cardiovascular en estos pacientes. Es posible por tanto que fármacos que limiten las concentraciones séricas de FABP4 o sus potenciales efectos puedan suponer un beneficio terapéutico en pacientes tratados con DP.

Conclusiones

1. Confirmamos que el ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico (PSA-3-49) es ligando de FABP4 con una IC₅₀ estimada de 0,274 μ M.
2. El compuesto PSA-3-49 no es inhibidor de la función proinflamatoria descrita para FABP4.
3. El tratamiento con el compuesto PSA-3-49 disminuye la liberación de FABP4 soluble en explantes de grasa humana.
4. El tratamiento con medio condicionado de adipocitos aumenta la fosforilación de la proteína quinasa AKT inducida por insulina en hepatocitos y el compuesto PSA-3-49 inhibe este efecto de forma dependiente de dosis.
5. El compuesto derivado del piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indolinio EBM T78d inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias en células humanas del linaje mielomonocítico estimuladas a través de TLR4 o TLR3 y la administración del compuesto *in vivo* moduló la respuesta a LPS en ratón.
6. El pre-tratamiento con el compuesto EBM T78d inhibe la producción de las citoquinas IL-6 y leptina inducidas por LPS en adipocitos humanos.
7. El compuesto EBM T78d inhibe la expresión génica de TNF- α e IL-6 inducidas por LPS; así como la actividad del factor de transcripción NF- κ B en respuesta a LPS y TNF- α .
8. Los niveles séricos de FABP4 podrían ser un marcador de riesgo cardiovascular en pacientes en diálisis peritoneal.
9. La correlación entre los niveles séricos de la quimioquina CCL18 y FABP4 sugiere que la concentración de CCL18 en suero podría ser también marcador predictor de riesgo cardiovascular en pacientes en diálisis peritoneal.
10. Compuestos tales como PSA-3-49, capaces de reducir los niveles plasmáticos de FABP4 o sus posibles efectos deletéreos sobre tejidos diana, podrían ser de interés terapéutico en pacientes en DP con riesgo cardiovascular.

Bibliografía

- ALI, A. T., HOCHFELD, W. E., MYBURGH, R. & PEPPER, M. S. 2013. Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*, 92, 229-36.
- AOUADI, M., TENCEROVA, M., VANGALA, P., YAWE, J. C., NICOLORO, S. M., AMANO, S. U., COHEN, J. L. & CZECH, M. P. 2013. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 8278-83.
- APOVIAN, C. M., BIGORNIA, S., MOTT, M., MEYERS, M. R., ULLOOR, J., GAGUA, M., MCDONNELL, M., HESS, D., JOSEPH, L. & GOKCE, N. 2008. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular Biology*, 28, 1654-9.
- BABAEV, V. R., RUNNER, R. P., FAN, D., DING, L., ZHANG, Y., TAO, H., ERBAY, E., GORGUN, C. Z., FAZIO, S., HOTAMISLIGIL, G. S. & LINTON, M. F. 2011. Macrophage *Mall* deficiency suppresses atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-regulated genes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31, 1283-90.
- BAGHERI, R., QASIM, A. N., MEHTA, N. N., TEREMBULA, K., KAPOOR, S., BRAUNSTEIN, S., SCHUTTA, M., IQBAL, N., LEHRKE, M. & REILLY, M. P. 2010. Relation of plasma fatty acid binding proteins 4 and 5 with the metabolic syndrome, inflammation and coronary calcium in patients with type-2 diabetes mellitus. *The American journal of cardiology*, 106, 1118-23.
- BAI, Y. & SUN, Q. 2015. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obesity Reviews*, 16, 127-36.
- BALCI, M. M., ARSLAN, U., FIRAT, H., KOCAOGLU, I., VURAL, M. G., BALCI, K. G., MADEN, O., GURBUZ, O. A., ARDIC, S. & YETER, E. 2012. Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein are independently associated with left ventricular mass and myocardial performance index in obstructive sleep apnea syndrome. *Journal of investigative medicine*, 60, 1020-6.
- BAYS, H. E., GONZALEZ-CAMPOY, J. M., BRAY, G. A., KITABCHI, A. E., BERGMAN, D. A., SCHORR, A. B., RODBARD, H. W. & HENRY, R. R. 2008. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert review of cardiovascular therapy*, 6, 343-68.
- BELLON, T., MARTINEZ, V., LUCENDO, B., DEL PESO, G., CASTRO, M. J., AROEIRA, L. S., RODRIGUEZ-SANZ, A., OSSORIO, M., SANCHEZ-VILLANUEVA, R., SELGAS, R. & BAJO, M. A. 2011. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 26, 2995-3005.
- BERG, A. H. & SCHERER, P. E. 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research*, 96, 939-49.
- BODLES, A. M., VARMA, V., YAO-BORENGASSER, A., PHANAVANH, B., PETERSON, C. A., MCGEHEE, R. E., JR., RASOULI, N., WABITSCH, M. & KERN, P. A. 2006. Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue. *Journal of lipid research*, 47, 2080-8.
- BOORD, J. B., MAEDA, K., MAKOWSKI, L., BABAEV, V. R., FAZIO, S., LINTON, M. F. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2004. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 110, 1492-8.

- BURAK, M. F., INOUE, K. E., WHITE, A., LEE, A., TUNCMAN, G., CALAY, E. S., SEKIYA, M., TIROSH, A., EGUCHI, K., BIRRANE, G., LIGHTWOOD, D., HOWELLS, L., ODEDE, G., HAILU, H., WEST, S., GARLISH, R., NEALE, H., DOYLE, C., MOORE, A. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2015. Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. *Science translational medicine*, 7, 319ra205.
- BURCELIN, R. 2013. [New insights into adipose cell biology]. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 197, 79-92.
- BUTTGEREIT, F., DEJACO, C., MATTESON, E. L. & DASGUPTA, B. 2016. Polymyalgia Rheumatica and Giant Cell Arteritis: A Systematic Review. *Jama*, 315, 2442-58.
- CABRE, A., LAZARO, I., GIRONA, J., MANZANARES, J. M., MARIMON, F., PLANA, N., HERAS, M. & MASANA, L. 2008. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *Journal of lipid research*, 49, 1746-51.
- CANCELLO, R. & CLEMENT, K. 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG:an international journal of obstetrics and gynaecology*, 113, 1141-7.
- CANCELLO, R., HENEGAR, C., VIGUERIE, N., TALEB, S., POITOU, C., ROUAULT, C., COUPAYE, M., PELLOUX, V., HUGOL, D., BOUILLOT, J. L., BOULOUMIE, A., BARBATELLI, G., CINTI, S., SVENSSON, P. A., BARSH, G. S., ZUCKER, J. D., BASDEVANT, A., LANGIN, D. & CLEMENT, K. 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54, 2277-86.
- CAO, H., SEKIYA, M., ERTUNC, M. E., BURAK, M. F., MAYERS, J. R., WHITE, A., INOUE, K., RICKEY, L. M., ERCAL, B. C., FURUHASHI, M., TUNCMAN, G. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2013. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell metabolism*, 17, 768-78.
- CINTI, S., MITCHELL, G., BARBATELLI, G., MURANO, I., CERESI, E., FALOIA, E., WANG, S., FORTIER, M., GREENBERG, A. S. & OBIN, M. S. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46, 2347-55.
- COTTAM, D. R., MATTAR, S. G., BARINAS-MITCHELL, E., EID, G., KULLER, L., KELLEY, D. E. & SCHAUER, P. R. 2004. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obesity Surgery*, 14, 589-600.
- CREELY, S. J., MCTERNAN, P. G., KUSMINSKI, C. M., FISHER F, M., DA SILVA, N. F., KHANOLKAR, M., EVANS, M., HARTE, A. L. & KUMAR, S. 2007. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292, E740-7.
- CHAWLA, A., BARAK, Y., NAGY, L., LIAO, D., TONTONOZ, P. & EVANS, R. M. 2001. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature medicine*, 7, 48-52.
- CHEN, G. & GOEDDEL, D. V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296, 1634-5.

- CHMURZYNSKA, A. 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of applied genetics*, 47, 39-48.
- CHRISTIANSEN, T., RICHELSEN, B. & BRUUN, J. M. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *International Journal of Obesity*, 29, 146-50.
- CHUNG, I. Y. & BENVENISTE, E. N. 1990. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *Journal of Immunology*, 144, 2999-3007.
- DE JAGER, S. C., BONGAERTS, B. W., WEBER, M., KRAAIJEVELD, A. O., ROUSCH, M., DIMMELER, S., VAN DIEIJEN-VISSER, M. P., CLEUTJENS, K. B., NELEMANS, P. J., VAN BERKEL, T. J. & BIESSEN, E. A. 2012. Chemokines CCL3/MIP1alpha, CCL5/RANTES and CCL18/PARC are independent risk predictors of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes. *PLoS One*, 7, e45804.
- DE OLIVEIRA, R., MORAES, T. I., CERDA, A., HIRATA, M. H., FAJARDO, C. M., SOUSA, M. C., DOREA, E. L., BERNIK, M. M. & HIRATA, R. D. 2015. ADIPOQ and IL6 variants are associated with a pro-inflammatory status in obesities with cardiometabolic dysfunction. *Diabetology & metabolic syndrome*, 7, 34.
- EEG-OLOFSSON, K., CEDERHOLM, J., NILSSON, P. M., ZETHELIUS, B., NUNEZ, L., GUDBJORNSDOTTIR, S. & ELIASSON, B. 2009. Risk of cardiovascular disease and mortality in overweight and obese patients with type 2 diabetes: an observational study in 13,087 patients. *Diabetologia*, 52, 65-73.
- ESFAHANI, M., MOVAHEDIAN, A., BARANCHI, M. & GOODARZI, M. T. 2015. Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18, 430-42.
- ESPOSITO, K., PONTILLO, A., CIOTOLA, M., DI PALO, C., GRELLA, E., NICOLETTI, G. & GIUGLIANO, D. 2002. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87, 3864-6.
- FANTUZZI, G. 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 115, 911-9; quiz 920.
- FARMER, S. R. 2008. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes & development*, 22, 1269-75.
- FEINGOLD, K. R., DOERRLER, W., DINARELLO, C. A., FIERIS, W. & GRUNFELD, C. 1992. Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology*, 130, 10-6.
- FINKELSTEIN, E. A., KHAVJOU, O. A., THOMPSON, H., TROGDON, J. G., PAN, L., SHERRY, B. & DIETZ, W. 2012. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *American journal of preventive medicine*, 42, 563-70.
- FORTES, P. C., DE MORAES, T. P., MENDES, J. G., STINGHEN, A. E., RIBEIRO, S. C. & PECOITS-FILHO, R. 2009. Insulin resistance and glucose homeostasis in peritoneal dialysis. *Peritoneal dialysis international*, 29 Suppl 2, S145-8.
- FRIED, S. K., BUNKIN, D. A. & GREENBERG, A. S. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 83, 847-50.

- FRIEDMAN, J. M. 2002. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutrition Reviews*, 60, S1-14; discussion S68-84, 85-7.
- FU, Y., LUO, N., LOPES-VIRELLA, M. F. & GARVEY, W. T. 2002. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 165, 259-69.
- FURUHASHI, M., FUCHO, R., GORGUN, C. Z., TUNCMAN, G., CAO, H. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2008. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118, 2640-2650.
- FURUHASHI, M. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 7, 489-503.
- FURUHASHI, M., ISHIMURA, S., OTA, H., HAYASHI, M., NISHITANI, T., TANAKA, M., YOSHIDA, H., SHIMAMOTO, K., HOTAMISLIGIL, G. S. & MIURA, T. 2011a. Serum fatty acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *PLoS One*, 6, e27356.
- FURUHASHI, M., ISHIMURA, S., OTA, H. & MIURA, T. 2011b. Lipid chaperones and metabolic inflammation. *International journal of inflammation*, 2011, 642612.
- FURUHASHI, M., SAITOH, S., SHIMAMOTO, K. & MIURA, T. 2014. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights. Cardiology*, 8, 23-33.
- FURUHASHI, M., TUNCMAN, G., GOERGUEEN, C. Z., MAKOWSKI, L., ATSUMI, G., VAILLANCOURT, E., KONO, K., BABAEV, V. R., FAZIO, S., LINTON, M. F., SULSKY, R., ROBL, J. A., PARKER, R. A. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2007. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*, 447, 959-U2.
- FURUHASHI, M., URA, N., HASEGAWA, K., TSUCHIHASHI, K., NAKATA, T. & SHIMAMOTO, K. 2004. Utility of serum ratio of heart-type fatty acid-binding protein to myoglobin for cardiac damage regardless of renal dysfunction. *Circulation journal* 68, 656-9.
- GAN, L., GUO, K., CREMONA, M. L., MCGRAW, T. E., LEIBEL, R. L. & ZHANG, Y. 2012. TNF-alpha up-regulates protein level and cell surface expression of the leptin receptor by stimulating its export via a PKC-dependent mechanism. *Endocrinology*, 153, 5821-33.
- GESTA, S., TSENG, Y. H. & KAHN, C. R. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131, 242-56.
- GHOSH, G., WANG, V. Y., HUANG, D. B. & FUSCO, A. 2012. NF-kappaB regulation: lessons from structures. *Immunological Reviews*, 246, 36-58.
- GOLEMBIEWSKA, E., SAFRANOW, K., CIECHANOWSKI, K., BOBER, J., BOGACKA, A. & STEPNIEWSKA, J. 2013. Adipokines and parameters of peritoneal membrane transport in newly started peritoneal dialysis patients. *Acta biochimica Polonica*, 60, 617-21.
- GONZALEZ-MATEO, G. T., LOUREIRO, J., JIMENEZ-HEFFERMAN, J. A., BAJO, M. A., SELGAS, R., LOPEZ-CABRERA, M. & AROEIRA, L. S. 2009. Chronic exposure of mouse peritoneum to peritoneal dialysis fluid: structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *Peritoneal dialysis*

- international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 29, 227-30.
- GOOZ, M. 2010. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45, 146-69.
- GORDON, G. B. 1977. Saturated free fatty acid toxicity. II. Lipid accumulation, ultrastructural alterations, and toxicity in mammalian cells in culture. *Experimental and molecular pathology*, 27, 262-76.
- GRANT, R. W. & STEPHENS, J. M. 2015. Fat in flames: influence of cytokines and pattern recognition receptors on adipocyte lipolysis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 309, E205-13.
- GREGOR, M. F. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2011. Inflammatory Mechanisms in Obesity. In: PAUL, W. E., LITTMAN, D. R. & YOKOYAMA, W. M. (eds.) *Annual Review of Immunology*, Vol 29.
- GRUNFELD, C., ZHAO, C., FULLER, J., POLLACK, A., MOSER, A., FRIEDMAN, J. & FEINGOLD, K. R. 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *The Journal of clinical investigation*, 97, 2152-7.
- HAGBERG, C. E., MEHLEM, A., FALKEVALL, A., MUHL, L., FAM, B. C., ORTSATER, H., SCOTNEY, P., NYQVIST, D., SAMEN, E., LU, L., STONE-ELANDER, S., PROIETTO, J., ANDRIKOPOULOS, S., SJOHOLM, A., NASH, A. & ERIKSSON, U. 2012. Targeting VEGF-B as a novel treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 490, 426-30.
- HAGG, D. A., OLSON, F. J., KJELLDAHL, J., JERNAS, M., THELLE, D. S., CARLSSON, L. M., FAGERBERG, B. & SVENSSON, P. A. 2009. Expression of chemokine (C-C motif) ligand 18 in human macrophages and atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 204, e15-20.
- HANSSON, G. K. & HERMANSSON, A. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*, 12, 204-12.
- HAUNER, H. 2002. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 18 Suppl 2, S10-5.
- HIROSUMI, J., TUNCMAN, G., CHANG, L., GORGUN, C. Z., UYSAL, K. T., MAEDA, K., KARIN, M. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420, 333-6.
- HORIUCHI, T., MITOMA, H., HARASHIMA, S., TSUKAMOTO, H. & SHIMODA, T. 2010. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*, 49, 1215-28.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-7.
- HOTAMISLIGIL, G. S. & BERNLOHR, D. A. 2015. Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 11, 592-605.
- HOTAMISLIGIL, G. S. & ERBAY, E. 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology*, 8, 923-34.
- HOTAMISLIGIL, G. S., JOHNSON, R. S., DISTEL, R. J., ELLIS, R., PAPAIOANNOU, V. E. & SPIEGELMAN, B. M. 1996. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, 274, 1377-1379.
- HOTAMISLIGIL, G. S., MURRAY, D. L., CHOY, L. N. & SPIEGELMAN, B. M. 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4854-8.
- HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S. & SPIEGELMAN, B. M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87-91.
- HSU, L., SNODGRASS, B. T. & ARMSTRONG, A. W. 2014. Antidrug antibodies in psoriasis: a systematic review. *The British journal of dermatology*, 170, 261-73.
- HUI, X., LI, H., ZHOU, Z., LAM, K. S., XIAO, Y., WU, D., DING, K., WANG, Y., VANHOUTTE, P. M. & XU, A. 2010. Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1. *The Journal of biological chemistry*, 285, 10273-80.
- HUNT, C. R., RO, J. H., DOBSON, D. E., MIN, H. Y. & SPIEGELMAN, B. M. 1986. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 3786-90.
- ISHIMURA, S., FURUHASHI, M., WATANABE, Y., HOSHINA, K., FUSEYA, T., MITA, T., OKAZAKI, Y., KOYAMA, M., TANAKA, M., AKASAKA, H., OHNISHI, H., YOSHIDA, H., SAITOH, S. & MIURA, T. 2013. Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One*, 8, e81318.
- IWABU, M., YAMAUCHI, T., OKADA-IWABU, M., SATO, K., NAKAGAWA, T., FUNATA, M., YAMAGUCHI, M., NAMIKI, S., NAKAYAMA, R., TABATA, M., OGATA, H., KUBOTA, N., TAKAMOTO, I., HAYASHI, Y. K., YAMAUCHI, N., WAKI, H., FUKAYAMA, M., NISHINO, I., TOKUYAMA, K., UEKI, K., OIKE, Y., ISHII, S., HIROSE, K., SHIMIZU, T., TOUHARA, K. & KADOWAKI, T. 2010. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature*, 464, 1313-9.
- JIANG, S., SONG, K., FENG, S. & SHI, Y. B. 2015. Association between serum leptin levels and peritoneal dialysis: A meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine*, 10, 300-308.
- KADOWAKI, T. & YAMAUCHI, T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*, 26, 439-51.
- KAESS, B. M., ENSERRO, D. M., MCMANUS, D. D., XANTHAKIS, V., CHEN, M. H., SULLIVAN, L. M., INGRAM, C., O'DONNELL, C. J., KEANEY, J. F., VASAN, R. S. & GLAZER, N. L. 2012. Cardiometabolic correlates and heritability of fetuin-A, retinol-binding protein 4, and fatty-acid binding protein 4 in the Framingham Heart Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97, E1943-7.
- KAMEI, N., TOBE, K., SUZUKI, R., OHSUGI, M., WATANABE, T., KUBOTA, N., OHTSUKA-KOWATARI, N., KUMAGAI, K., SAKAMOTO, K., KOBAYASHI, M., YAMAUCHI, T., UEKI, K., OISHI, Y., NISHIMURA, S., MANABE, I., HASHIMOTO, H., OHNISHI, Y., OGATA, H., TOKUYAMA, K., TSUNODA, M., IDE, T., MURAKAMI, K., NAGAI, R. & KADOWAKI, T. 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *The Journal of biological chemistry*, 281, 26602-14.
- KANE, C. D. & BERNLOHR, D. A. 1996. A simple assay for intracellular lipid-binding proteins using displacement of 1-anilinonaphthalene 8-sulfonic acid. *Analytical biochemistry*, 233, 197-204.

- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, 13, 460-9.
- KAZEMI, M. R., MCDONALD, C. M., SHIGENAGA, J. K., GRUNFELD, C. & FEINGOLD, K. R. 2005. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25, 1220-4.
- KIM, F., PHAM, M., LUTTRELL, I., BANNERMAN, D. D., TUPPER, J., THALER, J., HAWN, T. R., RAINES, E. W. & SCHWARTZ, M. W. 2007. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research*, 100, 1589-96.
- KLETZIEN, R. F., FOELLM, L. A., HARRIS, P. K., WYSE, B. M. & CLARKE, S. D. 1992. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Molecular pharmacology*, 42, 558-62.
- KOBAYASHI, S., MAESATO, K., MORIYA, H., OHTAKE, T. & IKEDA, T. 2005. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *American journal of kidney diseases*, 45, 275-80.
- KODELJA, V., MULLER, C., POLITZ, O., HAKIJ, N., ORFANOS, C. E. & GOERDT, S. 1998. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *Journal of immunology*, 160, 1411-8.
- KOHM, M., BURKHARDT, H. & BEHRENS, F. 2015. Anti-TNFalpha-therapy as an evidence-based treatment option for different clinical manifestations of psoriatic arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*, 33, S109-14.
- KOPPAKA, S., KEHLENBRINK, S., CAREY, M., LI, W., SANCHEZ, E., LEE, D. E., LEE, H., CHEN, J., CARRASCO, E., KISHORE, P., ZHANG, K. & HAWKINS, M. 2013. Reduced adipose tissue macrophage content is associated with improved insulin sensitivity in thiazolidinedione-treated diabetic humans. *Diabetes*, 62, 1843-54.
- KRALISCH, S., EBERT, T., LOSSNER, U., JESSNITZER, B., STUMVOLL, M. & FASSHAUER, M. 2014. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *International journal of obesity*, 38, 1251-4.
- KROTKIEWSKI, M., BJORNTORP, P., SJOSTROM, L. & SMITH, U. 1983. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *The Journal of clinical investigation*, 72, 1150-62.
- KUEK, A., HAZLEMAN, B. L. & OSTOR, A. J. 2007. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. *Postgraduate medical journal*, 83, 251-60.
- KWON, H. & PESSIN, J. E. 2013. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Frontiers in endocrinology*, 4, 71.
- LAFONTAN, M. 2014. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab*, 40, 16-28.
- LAN, H., CHENG, C. C., KOWALSKI, T. J., PANG, L., SHAN, L., CHUANG, C. C., JACKSON, J., ROJAS-TRIANA, A., BOBER, L., LIU, L., VOIGT, J., ORTH, P., YANG, X., SHIPPS, G. W., JR. & HEDRICK, J. A. 2011. Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of lipid research*, 52, 646-56.

- LANTHIER, N. & LECLERCQ, I. A. 2014. Adipose tissues as endocrine target organs. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 28, 545-58.
- LEAL VDE, O. & MAFRA, D. 2013. Adipokines in obesity. *International journal of clinical chemistry*, 419, 87-94.
- LEE, B. C. & LEE, J. 2014. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1842, 446-62.
- LEE, J. 2013. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. *Archives of pharmacal research*, 36, 208-22.
- LEE, J. Y., SOHN, K. H., RHEE, S. H. & HWANG, D. 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, 276, 16683-9.
- LEE, K., SANTIBANEZ-KOREF, M., POLVIKOSKI, T., BIRCHALL, D., MENDELOW, A. D. & KEAVNEY, B. 2013. Increased expression of fatty acid binding protein 4 and leptin in resident macrophages characterises atherosclerotic plaque rupture. *Atherosclerosis*, 226, 74-81.
- LEE, M. J., WU, Y. & FRIED, S. K. 2010. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Current opinion in clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13, 371-6.
- LEHMANN, F., HAILE, S., AXEN, E., MEDINA, C., UPPENBERG, J., SVENSSON, S., LUNDBACK, T., RONDAHL, L. & BARF, T. 2004. Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4445-4448.
- LEHMANN, J. M., MOORE, L. B., SMITH-OLIVER, T. A., WILKISON, W. O., WILLSON, T. M. & KLIEWER, S. A. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of biological chemistry*, 270, 12953-6.
- LI, C. C., MUNITIC, I., MITTELSTADT, P. R., CASTRO, E. & ASHWELL, J. D. 2015. Suppression of Dendritic Cell-Derived IL-12 by Endogenous Glucocorticoids Is Protective in LPS-Induced Sepsis. *PLoS biology*, 13, e1002269.
- LI, Y., ZHANG, L., GU, Y., HAO, C. & ZHU, T. 2013. Insulin resistance as a predictor of cardiovascular disease in patients on peritoneal dialysis. *Peritoneal dialysis international*, 33, 411-8.
- LIANG, W., TONINI, G., MULDER, P., KELDER, T., VAN ERK, M., VAN DEN HOEK, A. M., MARIMAN, R., WIELINGA, P. Y., BACCINI, M., KOOISTRA, T., BIGGERI, A. & KLEEMANN, R. 2013. Coordinated and interactive expression of genes of lipid metabolism and inflammation in adipose tissue and liver during metabolic overload. *PLoS One*, 8, e75290.
- LORD, G. M., MATARESE, G., HOWARD, J. K., BAKER, R. J., BLOOM, S. R. & LECHLER, R. I. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394, 897-901.
- LOWRIE, E. G., LAZARUS, J. M., MOCELIN, A. J., BAILEY, G. L., HAMPERS, C. L., WILSON, R. E. & MERRILL, J. P. 1973. Survival of patients undergoing chronic hemodialysis and renal transplantation. *The New England journal of medicine*, 288, 863-7.
- LUMENG, C. N., BODZIN, J. L. & SALTIEL, A. R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*, 117, 175-84.

- MAACHI, M., PIERONI, L., BRUCKERT, E., JARDEL, C., FELLAHI, S., HAINQUE, B., CAPEAU, J. & BASTARD, J. P. 2004. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF α , leptin and IL-6 levels in obese women. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 28, 993-7.
- MAEDA, K., CAO, H., KONO, K., GORGUN, C. Z., FURUHASHI, M., UYSAL, K. T., CAO, Q., ATSUMI, G., MALONE, H., KRISHNAN, B., MINOKOSHI, Y., KAHN, B. B., PARKER, R. A. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2005. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell metabolism*, 1, 107-19.
- MAEDA, K., UYSAL, K. T., MAKOWSKI, L., GORGUN, C. Z., ATSUMI, G., PARKER, R. A., BRUNING, J., HERTZEL, A. V., BERNLOHR, D. A. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2003. Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 52, 300-7.
- MAKOWSKI, L., BOORD, J. B., MAEDA, K., BABAEV, V. R., UYSAL, K. T., MORGAN, M. A., PARKER, R. A., SUTTLES, J., FAZIO, S., HOTAMISLIGIL, G. S. & LINTON, M. F. 2001. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature Medicine*, 7, 699-705.
- MAKOWSKI, L., BRITTINGHAM, K. C., REYNOLDS, J. M., SUTTLES, J. & HOTAMISLIGIL, G. K. S. 2005. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity - Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I kappa B kinase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 12888-12895.
- MAKOWSKI, L. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2005. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 16, 543-548.
- MALAGON, M. M., DIAZ-RUIZ, A., GUZMAN-RUIZ, R., JIMENEZ-GOMEZ, Y., MORENO, N. R., GARCIA-NAVARRO, S., VAZQUEZ-MARTINEZ, R. & PEINADO, J. R. 2013. Adipobiology for novel therapeutic approaches in metabolic syndrome. *Current vascular pharmacology*, 11, 954-67.
- MARROQUI, L., GONZALEZ, A., NECO, P., CABALLERO-GARRIDO, E., VIEIRA, E., RIPOLL, C., NADAL, A. & QUESADA, I. 2012. Role of leptin in the pancreatic beta-cell: effects and signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology* 49, R9-17.
- MARTINEZ, F. O., SICA, A., MANTOVANI, A. & LOCATI, M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience*, 13, 453-61.
- MATTHEWS, V. B., ALLEN, T. L., RISIS, S., CHAN, M. H., HENSTRIDGE, D. C., WATSON, N., ZAFFINO, L. A., BABB, J. R., BOON, J., MEIKLE, P. J., JOWETT, J. B., WATT, M. J., JANSSON, J. O., BRUCE, C. R. & FEBBRAIO, M. A. 2010. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*, 53, 2431-41.
- MCKELLAR, G. E., MCCAREY, D. W., SATTAR, N. & MCINNES, I. B. 2009. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nature Reviews Cardiology*, 6, 410-7.
- MOONEY, R. A. 2007. Counterpoint: Interleukin-6 does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *Journal of applied physiology*, 102, 816-8; discussion 818-9.

- MORRISON, M. C. & KLEEMANN, R. 2015. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Obesity, Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Associated Hepatic Co-Morbidities: A Comprehensive Review of Human and Rodent Studies. *Frontiers in immunology*, 6, 308.
- MOSETI, D., REGASSA, A. & KIM, W. K. 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *International journal of molecular sciences*, 17.
- NEELS, J. G. & OLEFSKY, J. M. 2006. Inflamed fat: what starts the fire? *The Journal of clinical investigation*, 116, 33-5.
- NICKEL, W. & RABOUILLE, C. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, 148-55.
- OCKNER, R. K., MANNING, J. A., POPPENHAUSEN, R. B. & HO, W. K. 1972. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, 177, 56-8.
- OECKINGHAUS, A., HAYDEN, M. S. & GHOSH, S. 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nature immunology*, 12, 695-708.
- OLEFSKY, J. M. & GLASS, C. K. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*, 72, 219-46.
- ORTEGA, N., DONA, I., MORENO, E., AUDICANA, M. T., BARASONA, M. J., BERGES-GIMENO, M. P., BLANCA-LOPEZ, N., LOBERA, T., PADIAL, A., ROSADO, A. & TORRES, M. J. 2014. Practical guidelines for diagnosing hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 24, 308-23.
- OTA, H., FURUHASHI, M., ISHIMURA, S., KOYAMA, M., OKAZAKI, Y., MITA, T., FUSEYA, T., YAMASHITA, T., TANAKA, M., YOSHIDA, H., SHIMAMOTO, K. & MIURA, T. 2012. Elevation of fatty acid-binding protein 4 is predisposed by family history of hypertension and contributes to blood pressure elevation. *American journal of hypertension*, 25, 1124-30.
- OUCHI, N., PARKER, J. L., LUGUS, J. J. & WALSH, K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11, 85-97.
- PAZ-FILHO, G., MASTRONARDI, C., FRANCO, C. B., WANG, K. B., WONG, M. L. & LICINIO, J. 2012. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 56, 597-607.
- PEDERSEN, B. K. & FEBBRAIO, M. A. 2007. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *Journal of applied physiology*, 102, 814-6.
- PEDERSEN, D. J., GUILHERME, A., DANAI, L. V., HEYDA, L., MATEVOSSIAN, A., COHEN, J., NICOLORO, S. M., STRAUBHAAR, J., NOH, H. L., JUNG, D., KIM, J. K. & CZECH, M. P. 2015. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Molecular metabolism*, 4, 507-18.
- QUEIPO-ORTUNO, M. I., ESCOTE, X., CEPERUELO-MALLAFRE, V., GARRIDO-SANCHEZ, L., MIRANDA, M., CLEMENTE-POSTIGO, M., PEREZ-PEREZ, R., PERAL, B., CARDONA, F., FERNANDEZ-REAL, J. M., TINAHONES, F. J. & VENDRELL, J. 2012. FABP4 dynamics in obesity: discrepancies in adipose tissue and liver expression regarding circulating plasma levels. *PLoS One*, 7, e48605.

- QUINN, C. E., HAMILTON, P. K., LOCKHART, C. J. & MCVEIGH, G. E. 2008. Thiazolidinediones: effects on insulin resistance and the cardiovascular system. *British journal of pharmacology*, 153, 636-45.
- RANJITH-KUMAR, C. T., MILLER, W., XIONG, J., RUSSELL, W. K., LAMB, R., SANTOS, J., DUFFY, K. E., CLEVELAND, L., PARK, M., BHARDWAJ, K., WU, Z., RUSSELL, D. H., SARISKY, R. T., MBOW, M. L. & KAO, C. C. 2007. Biochemical and functional analyses of the human Toll-like receptor 3 ectodomain. *The Journal of biological chemistry*, 282, 7668-78.
- RODRIGUEZ-SANZ, A., SANCHEZ-ALONSO, P., BELLON, T., ALAJARIN, R., MARTINEZ-CABEZA, V., SELGAS, R., VAQUERO, J. J. & ALVAREZ-BUILLA, J. 2015. Synthesis and biological evaluation of pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indolinium and pyridazino[1,6-a]benzimidazolium salts as anti-inflammatory agents. *European journal of medicinal chemistry*, 93, 83-92.
- ROLPH, M. S., YOUNG, T. R., SHUM, B. O., GORGUN, C. Z., SCHMITZ-PEIFFER, C., RAMSHAW, I. A., HOTAMISLIGIL, G. S. & MACKAY, C. R. 2006. Regulation of dendritic cell function and T cell priming by the fatty acid-binding protein AP2. *Journal of immunology*, 177, 7794-801.
- ROSEN, E. D. & SPIEGELMAN, B. M. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444, 847-53.
- RUAN, H. & LODISH, H. F. 2003. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 447-55.
- SAGHIZADEH, M., ONG, J. M., GARVEY, W. T., HENRY, R. R. & KERN, P. A. 1996. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 97, 1111-6.
- SANDOVAL, P., LOUREIRO, J., GONZALEZ-MATEO, G., PEREZ-LOZANO, M. L., MALDONADO-RODRIGUEZ, A., SANCHEZ-TOMERO, J. A., MENDOZA, L., SANTAMARIA, B., ORTIZ, A., RUIZ-ORTEGA, M., SELGAS, R., MARTIN, P., SANCHEZ-MADRID, F., AGUILERA, A. & LOPEZ-CABRERA, M. 2010. PPAR-gamma agonist rosiglitazone protects peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 90, 1517-32.
- SCHEJA, L., MAKOWSKI, L., UYSAL, K. T., WIESBROCK, S. M., SHIMSHEK, D. R., MEYERS, D. S., MORGAN, M., PARKER, R. A. & HOTAMISLIGIL, G. S. 1999. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2-/- mice. *Diabetes*, 48, 1987-94.
- SCHENK, S., SABERI, M. & OLEFSKY, J. M. 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 118, 2992-3002.
- SENN, J. J., KLOVER, P. J., NOWAK, I. A., ZIMMERS, T. A., KONIARIS, L. G., FURLANETTO, R. W. & MOONEY, R. A. 2003. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278, 13740-6.
- SHEBZUKHOV I U, V. & KUPRASH, D. V. 2011. [Transcriptional regulation of TNF/LT locus in immune cells]. *Molekuliarnaia biologii*, 45, 56-67.
- SHOELSON, S. E., LEE, J. & GOLDFINE, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 116, 1793-801.

- SMITKA, K. & MARESOVA, D. 2015. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague medical report*, 116, 87-111.
- SMORLESI, A., FRONTINI, A., GIORDANO, A. & CINTI, S. 2012. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obesity Reviews*, 13 Suppl 2, 83-96.
- SONG, J., REN, P., ZHANG, L., WANG, X. L., CHEN, L. & SHEN, Y. H. 2010. Metformin reduces lipid accumulation in macrophages by inhibiting FOXO1-mediated transcription of fatty acid-binding protein 4. *Biochemical and biophysical research communications*, 393, 89-94.
- SPENCER, M., YAO-BORENGASSER, A., UNAL, R., RASOULI, N., GURLEY, C. M., ZHU, B., PETERSON, C. A. & KERN, P. A. 2010. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 299, E1016-27.
- SPIEGELMAN, B. M. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 47, 507-14.
- SPIEGELMAN, B. M., CHOY, L., HOTAMISLIGIL, G. S., GRAVES, R. A. & TONTONOZ, P. 1993. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *The Journal of biological chemistry*, 268, 6823-6.
- STEPHENS, J. M., LEE, J. & PILCH, P. F. 1997. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry*, 272, 971-6.
- SUGANAMI, T., NISHIDA, J. & OGAWA, Y. 2005. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 25, 2062-8.
- SULSKY, R., MAGNIN, D. R., HUANG, Y., SIMPKINS, L., TAUNK, P., PATEL, M., ZHU, Y., STOUCH, T. R., BASSOLINO-KLIMAS, D., PARKER, R., HARRITY, T., STOFFEL, R., TAYLOR, D. S., LAVOIE, T. B., KISH, K., JACOBSON, B. L., SHERIFF, S., ADAM, L. P., EWING, W. R. & ROBL, J. A. 2007. Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17, 3511-5.
- TAN, N. S., SHAW, N. S., VINCKENBOSCH, N., LIU, P., YASMIN, R., DESVERGNE, B., WAHLI, W. & NOY, N. 2002. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Molecular and cellular biology*, 22, 5114-27.
- TATAR, E., DEMIRCI, M. S., KIRCELLI, F., GUNGOR, O., TURAN, M. N., SEVINC OK, E., ASCI, G., OZKAHYA, M. & OK, E. 2012. Association of insulin resistance with arterial stiffness in nondiabetic peritoneal dialysis patients. *International urology and nephrology*, 44, 255-62.
- TETA, D., MAILLARD, M., HALABI, G. & BURNIER, M. 2008. The leptin/adiponectin ratio: potential implications for peritoneal dialysis. *Kidney international*, S112-8.
- TONTONOZ, P., NAGY, L., ALVAREZ, J. G., THOMAZY, V. A. & EVANS, R. M. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93, 241-52.

- TRUJILLO, M. E. & SCHERER, P. E. 2005. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *Journal of internal medicine*, 257, 167-75.
- TSO, A. W., LAM, T. K., XU, A., YIU, K. H., TSE, H. F., LI, L. S., LAW, L. S., CHEUNG, B. M., CHEUNG, R. T. & LAM, K. S. 2011. Serum adipocyte fatty acid-binding protein associated with ischemic stroke and early death. *Neurology*, 76, 1968-75.
- TSO, A. W., XU, A., SHAM, P. C., WAT, N. M., WANG, Y., FONG, C. H., CHEUNG, B. M., JANUS, E. D. & LAM, K. S. 2007. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care*, 30, 2667-72.
- UYSAL, K. T., SCHEJA, L., WIESBROCK, S. M., BONNER-WEIR, S. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2000. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*, 141, 3388-3396.
- UYSAL, K. T., WIESBROCK, S. M., MARINO, M. W. & HOTAMISLIGIL, G. S. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389, 610-4.
- WAHLI, W. & MICHALIK, L. 2012. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism*, 23, 351-63.
- WANG, A. Y. 2007. The "heart" of peritoneal dialysis. *Peritoneal dialysis international*, 27 Suppl 2, S228-32.
- WANG, J., BADEANLOU, L., BIELAWSKI, J., CIARALDI, T. P. & SAMAD, F. 2014. Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 306, E756-68.
- WANG, Y., VISCARRA, J., KIM, S. J. & SUL, H. S. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16, 678-89.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W., JR. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112, 1796-808.
- WELLEN, K. E. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112, 1785-8.
- WELLEN, K. E. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 115, 1111-9.
- WU, Z., ROSEN, E. D., BRUN, R., HAUSER, S., ADELMANT, G., TROY, A. E., MCKEON, C., DARLINGTON, G. J. & SPIEGELMAN, B. M. 1999. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular Cell* 3, 151-8.
- XU, A., TSO, A. W., CHEUNG, B. M., WANG, Y., WAT, N. M., FONG, C. H., YEUNG, D. C., JANUS, E. D., SHAM, P. C. & LAM, K. S. 2007. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*, 115, 1537-43.
- XU, A., WANG, Y., XU, J. Y., STEJSKAL, D., TAM, S., ZHANG, J., WAT, N. M., WONG, W. K. & LAM, K. S. 2006. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clinical chemistry*, 52, 405-13.
- XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. & CHEN, H. 2003. Chronic

- inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 112, 1821-30.
- YEUNG, D. C., WANG, Y., XU, A., CHEUNG, S. C., WAT, N. M., FONG, D. Y., FONG, C. H., CHAU, M. T., SHAM, P. C. & LAM, K. S. 2008. Epidermal fatty-acid-binding protein: a new circulating biomarker associated with cardio-metabolic risk factors and carotid atherosclerosis. *European heart journal*, 29, 2156-63.
- YEUNG, D. C., XU, A., CHEUNG, C. W., WAT, N. M., YAU, M. H., FONG, C. H., CHAU, M. T. & LAM, K. S. 2007. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27, 1796-802.
- YEUNG, D. C., XU, A., TSO, A. W., CHOW, W. S., WAT, N. M., FONG, C. H., TAM, S., SHAM, P. C. & LAM, K. S. 2009. Circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins in relation to nephropathy staging and macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 32, 132-4.
- YOO, H. J. & CHOI, K. M. 2014. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes*, 5, 357-63.
- ZHANG, H. H., HALBLEIB, M., AHMAD, F., MANGANIELLO, V. C. & GREENBERG, A. S. 2002. Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*, 51, 2929-35.
- ZHANG, W., MOTTILLO, E. P., ZHAO, J., GARTUNG, A., VANHECKE, G. C., LEE, J. F., MADDIPATI, K. R., XU, H., AHN, Y. H., PROIA, R. L., GRANNEMAN, J. G. & LEE, M. J. 2014. Adipocyte lipolysis-stimulated interleukin-6 production requires sphingosine kinase 1 activity. *The Journal of biological chemistry*, 289, 32178-85.
- ZICCARDI, P., NAPPO, F., GIUGLIANO, G., ESPOSITO, K., MARFELLA, R., CIOFFI, M., D'ANDREA, F., MOLINARI, A. M. & GIUGLIANO, D. 2002. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*, 105, 804-9.
- ZIMMERMAN, A. W. & VEERKAMP, J. H. 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cellular and molecular life sciences*, 59, 1096-116.
- ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. & HEDRICK, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7, 211-28.

Anexos

El trabajo incluido en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente patente y publicación:

Patente

Rafael Selgas, Teresa Bellón, Aránzazu Rodríguez-Sanz, Juan J. Vaquero, Ramón Alajarín, Julio Álvarez-Builla, Patricia Sánchez-Alonso. Uso de compuestos derivados de sales de piridazino [1',6':1,2]pirido[3,4-b] indolinio y piridazino[3,2-b]benzimidazolio como agentes antiinflamatorios. PCT/ES2014/070603

Publicación

Rodríguez-Sanz A, Sanchez-Alonso P, Bellon T, Alajarin R, Martinez-Cabeza V, Selgas R, Vaquero JJ, Alvarez-Builla J. Synthesis and biological evaluation of pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indolinium and pyridazino[1,6-a]benzimidazolium salts as anti-inflammatory agents. European journal of medicinal chemistry, 2015, 93, 83-92.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de enero de 2015 (29.01.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/011331 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/5025 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070603

(22) Fecha de presentación internacional:
25 de julio de 2014 (25.07.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201331143 25 de julio de 2013 (25.07.2013) ES

(71) Solicitantes: FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (FIBHULP) [ES/ES]; Paseo de La Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). UNIVERSIDAD DE ALCALÁ [ES/ES]; Plaza de San Diego, s/n, E-28801 Alcalá de Henares (Madrid) (ES).

(72) Inventores: SELGAS GUTIÉRREZ, Rafael; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), Paseo de La Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). BELLÓN HEREDIA, Teresa; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), Paseo de La Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). RODRÍGUEZ SANZ, Aranzazu Isabel; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), Paseo de La Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). VAQUERO LÓPEZ, Juan José; Universidad de Alcalá, Plaza de San Diego, S/n, E-28801 Alcalá de Henares (Madrid) (ES). ALAJARÍN FERRÁNDEZ, Ramón; Universidad de Alcalá, Plaza de San Diego, S/n, E-28801 Alcalá de Henares (Madrid) (ES).

ÁLVAREZ-BUILLA GÓMEZ, Julio; Universidad de Alcalá, Plaza de San Diego, S/n, E-28801 Alcalá de Henares (Madrid) (ES). SÁNCHEZ ALONSO, Patricia; Universidad de Alcalá, Plaza de San Diego, S/n, E-28801 Alcalá de Henares (Madrid) (ES).

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Angel; Glorieta Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: USE OF COMPOUNDS DERIVED FROM PYRIDAZINO[1',6':1,2]PYRIDO[3,4-B]INDOLE AND PYRIDAZINO[3,2-B]BENZIMIDAZOLE SALTS AS ANTI-INFLAMMATORY AGENTS

(54) Título : USO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE SALES DE PIRIDAZINO[1',6':1,2]PIRIDO[3,4-B]INDOLINIO Y PIRIDAZINO[3,2-B]BENZIMIDAZOLIO COMO AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

(57) Abstract: The invention relates to compounds of the families of pyridazinopyridoindole and pyridazinobenzimidazole salts, to the pharmaceutical compositions containing same, and to the use of same as anti-inflammatory agents by means of the inhibition of the production of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by monocytes and macrophages proinflammatory in mammals and in all of the diseases and conditions presenting high levels of said mediator, such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, asthma, bronchitis, chronic obstructive airway disease, psoriasis, allergic rhinitis, ankylosing spondylitis, hidradenitis suppurativa, dermatitis and any other inflammatory state presenting high levels of TNF- α .

(57) Resumen: La presente invención está relacionada con compuestos de las familias de sales de piridazinopiridoindolinio y piridazinobenzimidazolio, con las composiciones farmacéuticas que los contienen y con el uso de los mismos como agentes antiinflamatorios a través de la inhibición de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por monocitos y macrófagos proinflamatorios en mamíferos y en todas las enfermedades y condiciones en las que este mediador presenta niveles elevados, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, asma, bronquitis, enfermedad obstructiva de las vías respiratorias crónica, psoriasis, rinitis alérgica, espondilitis anquilosante, hidradenitis supurativa, dermatitis y cualquier otro estado inflamatorio que curse con niveles altos de TNF- α .

WO 2015/011331 A1

Uso de compuestos derivados de sales de piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indolinio y piridazino[3,2-b]benzimidazolio como agentes antiinflamatorios

La presente invención se refiere al uso de compuestos inhibidores de la
5 producción de TNF-alfa y por tanto útiles como agentes antiinflamatorios. Por
tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biomedicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La inflamación es un proceso fisiológico complejo y dinámico que se produce
en respuesta a un daño celular o tisular en un intento de defender al organismo
frente a una agresión externa. No obstante, la inflamación crónica puede estar
asociada a diversos procesos patológicos pudiendo ser el origen de los mismos
o contribuir a un agravamiento del cuadro clínico.

15

Aunque diversos tipos celulares participan en los procesos inflamatorios, los
macrófagos son los principales organizadores del proceso, contribuyendo en
gran medida a la producción de diversas citoquinas proinflamatorias.

20 El TNF- α es una citoquina inflamatoria producida por macrófagos, células de
linaje de macrófagos (células Kupffer), neutrófilos, basófilos, eosinófilos,
linfocitos, células NK, células LAK, células cebadas, células de la médula ósea,
fibroblastos, astrocitos, queratinocitos y otros tipos celulares. Sin embargo, los
macrófagos son los principales productores de TNF- α . Esta citoquina induce
25 apoptosis en varias líneas tumorales y en combinación con otras citoquinas
proinflamatorias es responsable de alteraciones en células endoteliales que
originan diversas patologías que afectan a la microvasculatura. Además TNF- α
promueve angiogénesis *in vivo*. En macrófagos estimula funciones microbicidas
y la biosíntesis de otras citoquinas. Aunque TNF- α se requiere para una
30 respuesta inmune normal, su sobre-expresión puede tener consecuencias
patológicas. Es el principal mediador de caquexia en pacientes con tumores y
es el principal responsable de algunos efectos graves durante sepsis por

bacterias Gram negativas. Además se ha demostrado que desempeña un papel clave en el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes y/o asociadas a inflamación crónica (artritis reumatoide, esclerosis múltiple).

- 5 La síntesis de $\text{TNF-}\alpha$ se induce por diferentes estímulos, incluido el $\text{IFN-}\gamma$; pero el estímulo más potente en macrófagos es el LPS presente en la pared de las bacterias Gram negativas. Recientemente se ha descrito además que moléculas que se liberan por las células del organismo cuando sufren un daño o agresión son también capaces de inducir la producción de $\text{TNF-}\alpha$.

10

Actualmente, los agentes antiinflamatorios esteroideos (hormonas) y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se utilizan para el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, estos agentes tienen diversos puntos de acción y no tienen una acción inhibidora específica para $\text{TNF-}\alpha$. Así, es probable que provoquen efectos secundarios perjudiciales, particularmente, los efectos secundarios de los antiinflamatorios esteroideos (corticoides) se han convertido en un problema médico.

15

Anti-TNF-alfa son los fármacos biológicos de más éxito hoy en día y están indicados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide crónica, artritis psoriásica, artritis idiopática autoinmune, psoriasis, espondilitis anquilosante, enfermedad Crohn y colitis ulcerosa, en las que han demostrado buenos resultados clínicos; pero tienen efectos secundarios como reacciones de hipersensibilidad, predisposición a infecciones que pueden ser graves como tuberculosis y sepsis, aumento del riesgo de desarrollo de tumores y el deterioro neuronal ocasionado por un efecto desmielinizante.

20

25

30

Durante los últimos años, varias estrategias encaminadas a inhibir selectivamente diversas citoquinas proinflamatorias han aportado terapias basadas en proteínas para enfermedades inflamatorias, validando la hipótesis terapéutica de que la intervención en la señalización a través de citoquinas puede aportar un beneficio terapéutico. Sin embargo, además de su

elevadísimo coste estos productos proteicos presentan el inconveniente de su administración por vía intravenosa.

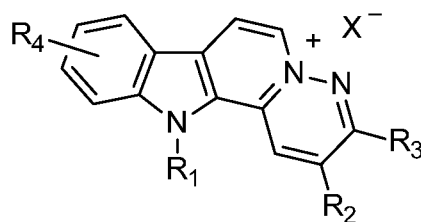
Por todo ello, se ha vuelto a prestar atención a nuevas estrategias encaminadas a desarrollar una nueva generación de inhibidores de TNF- α que permitan por ejemplo su administración por vía oral y que presenten pocos efectos secundarios. Además de interferir con la producción o señalización de citoquinas proinflamatorias con fármacos activos de administración oral combinarían la comodidad de los fármacos convencionales con la eficacia probada de las terapias biológicas.

La preparación de sales de piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indolinio y piridazino[3,2-b]benzimidazolio se ha descrito anteriormente a través de una secuencia de dos reacciones a partir de azinas y azoles que presentan un grupo metilo en la posición α al átomo de nitrógeno. La primera reacción consiste en una N-aminación con un agente aminante como HOSA (ácido O-hidroxilaminosulfónico) o MSH (mesitilensulfonato de hidroxilamina). Esta sal de N-amino azinio o azolio se hace reaccionar posteriormente con una 1,2-dicetona en presencia de una base para dar una doble condensación que conduce a la sal final.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevos inhibidores de TNF- α , y por tanto, útiles para la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias en mamíferos, preferiblemente en humanos.

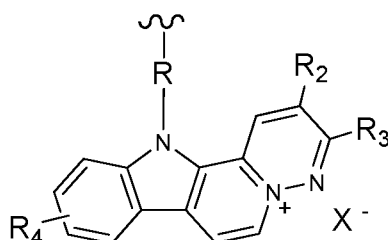
Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I):



(I)

donde:

R_1 se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}),
 5 alquenilo (C_2-C_{10}), alquinilo (C_2-C_{10}), $-(CH_2)_nCO_2R_1'$, $-(CH_2)_mR_1''$, $-(CH_2)_pCONHR_1'''$ o el grupo de fórmula (II):



(II)

10

donde R se selecciona de la lista que comprende alquilo (C_1-C_{20}), alquenilo (C_2-C_{20}), alquinilo (C_2-C_{20}), $-(CH_2)_nCO_2R_1'-O_2C(CH_2)_n-$ ó $-(CH_2)_pCONHR_1'''-NHOC(CH_2)_p-$; n, m o p tienen un valor de entre 0 y 5 y R_1' se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_{10}), R_1'' se selecciona de entre halógeno,
 15 alquenilo (C_2-C_4) o alquinilo (C_2-C_4) y R_1''' se selecciona de entre alquilo (C_1-C_4), alquenilo (C_2-C_4) o alquinilo (C_2-C_4);

R_2 y R_3 , son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C_1-C_{10}), cicloalquilo (C_3-C_6), arilo, heteroarilo o R_2 y R_3 pueden estar enlazados entre si formando parte de un anillo, saturado o aromático;

20 R_4 se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}), halógeno, nitro, amino, hidroxilo, $O-R_4'$, donde R_4' se selecciona entre un alquilo (C_1-C_{12}), arilo, aralquilo o heteroarilo; y

X^- es un anión biológica o farmacéuticamente aceptable;

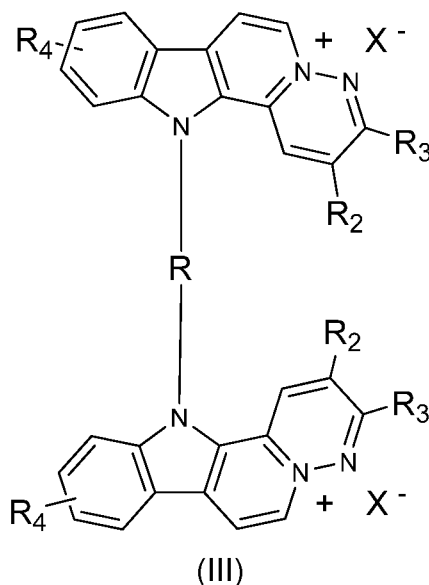
o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la elaboración de
 25 un medicamento para la inhibición de la producción de $TNF-\alpha$.

En una realización preferida, R_1 se selecciona de entre hidrógeno, $-(CH_2)_nCO_2R_1'$ o $-(CH_2)_mR_1''$.

- 5 En una realización más preferida, R_1' se selecciona de entre hidrógeno o alquilo (C_1 - C_{10}) y n es 0 ó 1, más preferiblemente, R_1' es hidrógeno, metilo, etilo o *terc*-butilo.

En otra realización más preferida, R_1'' es un halógeno o un alquínilo (C_2 - C_3) y m tiene un valor de 2 a 4, más preferiblemente R_1'' es yodo o etinilo y m es 3.

Cuando R_1 es el grupo de fórmula (II), el compuesto de la invención es de fórmula general (III):



15

donde R , R_2 , R_3 , R_4 y X^- se han descrito anteriormente.

En una realización preferida, R es alquilo (C_5 - C_{15}), alquenilo (C_5 - C_{15}) o alquínilo (C_5 - C_{15}), más preferiblemente R es deca-4,6-diin-1,10-diilo.

20

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (III), R_2 y R_3 , son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre metilo, etilo o 2-furilo o

están enlazados entre si formando el 1,8-naftodiilo. Más preferiblemente, R_2 y R_3 son iguales.

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (III), R_4 se
5 selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C_1 - C_3), halógeno, nitro, amino, $O-R_4'$, donde R_4' se selecciona entre un alquilo (C_1 - C_3) o arilo, más preferiblemente R_4 se selecciona entre amino, bromo, nitro, metoxilo o benzoxilo.

10 En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (III), X^- es haluro o mesitilensulfonato, más preferiblemente el haluro es bromuro, yoduro o cloruro.

El compuesto de fórmula general (I) o (III) se selecciona de la lista que
15 comprende:

- mesitilensulfonato de 9-bromo-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 4),
mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-11-nitropiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 7),
20 dicloruro de 11-amonio-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 8),
mesitilensulfonato de 10-benciloxi-12-*terc*-butoxicarbonil-2,3-dietilpiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 13),
bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio
25 (Compuesto 17),
mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 20),
bromuro de 2,3-dietil-12-etoxicarbonilmetil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 22),
30 yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23),

bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24),

mesitilensulfonato de 14-metoxi-16-(pent-4-

inil)acenafto[1'',2'':3',4']piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-9-inio (Compuesto

5 27)

mesitilensulfonato de 2,3-di-(2-furil)-10-metoxi-12-(pent-4-

inil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 28) y

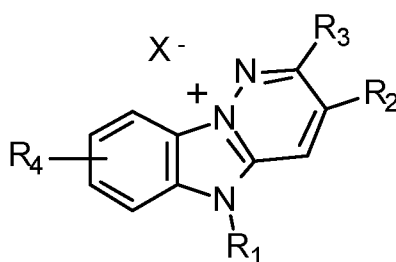
dimesitilensulfonato de 12,12'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio) (Compuesto 31).

10

En una realización más preferida el compuesto es bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 17).

Además del uso de los compuestos de fórmula general (I) y (III), la presente

15 invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (IV):



(IV)

donde:

R₁ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀),

20 alquenilo (C₂-C₁₀), alquinilo (C₂-C₁₀), -(CH₂)_nCO₂R₁', -(CH₂)_mR₁'', -(CH₂)_pCONHR₁'''' y donde n, m o p tienen un valor de entre 0 y 10 y R₁' se

selecciona entre hidrógeno y alquilo (C₁-C₁₀), R₁'' se selecciona entre halógeno y el grupo -⁺NR_aR_b-(CH₂)_q-R_c, donde R_a y R_b son iguales o diferentes y se seleccionan entre hidrógeno, alquilo (C₁-C₄), R_c se selecciona de entre

25 hidrógeno, alquilo(C₁-C₄) y el grupo -NR_a'R_b', donde R_a' y R_b' son iguales o diferentes, y se seleccionan entre hidrógeno, alquilo (C₁-C₄), q tiene un valor de

entre 0 y 10, y R_1''' se selecciona entre alquilo (C_1-C_4), alquenilo (C_2-C_4) o alquinilo (C_2-C_4);

R_2 y R_3 , son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C_1-C_{10}), cicloalquilo (C_3-C_6), arilo y heteroarilo; donde R_2 y R_3 pueden estar enlazados entre si formando parte de un anillo, saturado o aromático;

R_4 se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C_1-C_{10}), halógeno, nitro, amino, hidroxilo, $O-R_4'$, donde R_4' se selecciona entre un alquilo (C_1-C_{12}), arilo, aralquilo o heteroarilo; y

X^- es un anión biológica o farmacéuticamente aceptable,

o cualquiera de sus sales para la elaboración de un medicamento para la inhibición de la producción de $TNF-\alpha$.

En una realización preferida de los compuestos de fórmula (IV), R_1 es $-(CH_2)_nCO_2R_1'$, más preferible R_1' es hidrógeno o alquilo (C_1-C_4) y n es un número entre 1 y 5, aún más preferiblemente R_1' es hidrógeno o etilo.

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (IV), R_1 es $-(CH_2)_mR_1''$, más preferiblemente R_1'' es halógeno o el grupo $-^+NR_aR_b-(CH_2)_q-R_c$, donde R_a y R_b son iguales y se seleccionan entre hidrógeno o metilo, R_c es el grupo $-NR'_aR'_b$, donde R'_a y R'_b son iguales y se seleccionan entre hidrógeno, o metilo, y q tiene un valor de entre 1 y 3, más preferiblemente R_1'' es bromo o 4-amonio-7-aza-3,4,8-trimetiloctilo.

En una realización preferida de los compuestos de fórmula (IV), R_2 y R_3 , son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C_1-C_4), heteroarilo o están enlazados entre si formando parte de un anillo, más preferiblemente se seleccionan de entre metilo, etilo, 2-furilo o 1,8-naftodiilo y aún más preferiblemente son iguales o son 1,8-naftodiilo.

En una realización preferida de los compuestos de fórmula (IV), R_4 es hidrógeno.

En una realización más preferida de los compuestos de fórmula (IV), X^- es haluro, preferiblemente bromuro, o mesitilensulfonato, aún más preferiblemente X^- es bromuro.

- 5 Los compuestos de fórmula (IV) se pueden seleccionar de entre:
bromuro de 9-carboximetilacenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (compuesto 36),
bromuro de 9-(3-carboxipropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (compuesto 40) y
- 10 dibromuro de 9-(4,4,8-trimetil-8-aza-4-azoniononanil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (compuesto 43).

Cualquiera de los compuestos descritos en la presente invención, de fórmula general (I), (III) o (IV) se pueden utilizar como agentes antiinflamatorios que cursan a través de la inhibición de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I), (III) o (IV) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias, siendo estas enfermedades inflamatorias conocidas por un experto en la materia y más preferiblemente se pueden seleccionar de la lista que comprende artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática autoinmune, osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, uveitis, asma, bronquitis, enfermedad obstructiva de las vías respiratorias crónica, psoriasis, rinitis alérgica, espondilitis anquilosante, hidradenitis supurativa, dermatitis y cualquier otro estado inflamatorio con niveles altos de producción de TNF- α , incluyendo todo estado inflamatorio que suceda asociado a una enfermedad renal.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos seleccionados de la lista que comprende:

30 yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23),

- bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24),
bromuro de 9-carboximetilacenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (compuesto 36),
5 bromuro de 9-(3-carboxipropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (compuesto 40) y
dibromuro de 9-(4,4,8-trimetil-8-aza-4-azoniononanil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (compuesto 43).
- 10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto seleccionado de entre yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23), bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24), bromuro de
15 9-carboximetilacenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (compuesto 36), bromuro de 9-(3-carboxipropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (compuesto 40) y dibromuro de 9-(4,4,8-trimetil-8-aza-4-azoniononanil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (compuesto 43), además de un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 Opcionalmente esta composición farmacéutica también comprende otro principio activo, preferiblemente se puede seleccionar de entre un agente antiinflamatorio o un inhibidor de la producción de TNF- α .

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en
25 dichas composiciones son los vehículos conocidos por un experto en la materia.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto seleccionado de entre yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23), bromuro de
30 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24), bromuro de 9-carboximetilacenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-

a]benzimidazol-14-io (compuesto 36), bromuro de 9-(3-carboxipropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (compuesto 40) y dibromuro de 9-(4,4,8-trimetil-8-aza-4-azoniononanil) acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (compuesto 43), para la
5 elaboración de un medicamento.

Las composiciones farmacéuticas o medicamentos descritos en la presente invención se pueden administrar mediante cualquier preparación farmacéutica apropiada y conocida por cualquier experto en la materia, como ejemplos de
10 preparaciones farmacéuticas se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (geles, soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, nasal, tópica o parenteral. Preferiblemente la administración será vía oral o parenteral (inyectable).

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para inhibición de la producción de $\text{TNF-}\alpha$ o para el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias, más particularmente de las descritas anteriormente, en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la administración de
20 una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de fórmula (I), (III) o (IV). Preferiblemente, la administración de la composición se puede realizar por vía oral, o parenteral (inyectable).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad
25 terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la enfermedad, y de la ruta y frecuencia de administración.

30 Los compuestos descritos en la presente invención, de fórmula (I), (III) o (IV), se forman como sales biológica y farmacéuticamente aceptables. Las formas de sales útiles son los haluros, particularmente el yoduro, bromuro y el cloruro,

tosilatos, metanosulfonatos, brosilatos, fumaratos, maleatos, succinatos, acetatos, sales de mesitilensulfonato, y similares. Otras sales relacionadas se pueden formar utilizando de forma similar aniones no tóxicos que son biológica y farmacéuticamente aceptables.

5

El término “alquilo” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 10, y más preferiblemente entre 10 1 y 4, átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico arilo, hidroxilo, amino, amido, éster, éter, tiol, acilamino o carboxamido, que a su vez pueden opcionalmente estar sustituidos. Preferiblemente el grupo alquilo no está sustituido.

15

El término “alquenilo” se refiere en la presente invención a un radical alquilo, tal y como se ha definido anteriormente, y que tiene en su cadena al menos un doble enlace carbono-carbono.

20 El término “alquinilo” se refiere en la presente invención a un radical alquilo, tal y como se ha definido anteriormente, y que tiene en su cadena al menos un triple enlace carbono-carbono.

El término “cicloalquilo” se refiere, en la presente invención, a un radical de 25 cadena carbocíclica saturada y que consiste en átomos de carbono, entre 3 y 6, más preferiblemente 5 o 6. Puede estar opcionalmente sustituido con 1 o más sustituyentes del grupo formado por alquilo, hidroxilo, nitro, amino, halógeno, arilo o aralquilo.

30 El término “arilo” se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 5 a 18 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único ó múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Un

ejemplo, no limitante, de arilo es un grupo fenilo, naftilo, indenilo, furilo etc....El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido por al menos un grupo seleccionado de entre un hidroxilo, éster, carboxilo, alquilo o halógeno.

- 5 El término "aralquilo" se refiere, en la presente invención, a una cadena alifática de entre 1 y 5 átomos de carbono en la que al menos uno de los hidrógenos se ha sustituido por un grupo arilo, con las acepciones anteriores, como por ejemplo, pero sin limitarse, un grupo bencilo o fenetilo. Estos grupos aralquilo pueden, a su vez, estar opcionalmente sustituidos por un grupo alquilo, hidroxilo, 10 nitro, amino o halógeno. Preferiblemente es un grupo bencilo, opcionalmente sustituido, y más preferiblemente es un grupo bencilo que no está sustituido.

El término "heteroarilo" se refiere, en la presente invención, a un radical de cadena carbocíclica (mono- o bicíclicos) y que consiste en átomos de carbono, 15 entre 3 y 6, más preferiblemente 5 o 6, donde al menos un átomo de carbono es sustituido por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno o azufre. Esta cadena carbocíclica puede estar insaturada o parcialmente saturada. Puede estar opcionalmente sustituida por 1 o más sustituyentes del grupo formado por alquilo, hidroxilo, nitro, amino, halógeno, 20 arilo o aralquilo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas 25 y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Viabilidad celular de la línea promonocítica humana THP-1 preincubada

durante 24 horas con concentraciones crecientes de algunos compuestos de las Fórmulas (I) y (III) en presencia o ausencia de 100 ng/ml de LPS.

Fig. 2. Efecto de algunos compuestos de Fórmulas (I) y (III) en la producción de
5 TNF- α inducida por LPS (100 ng/ml) en la línea celular promonocítica humana THP-1.

Fig. 3. Efecto del compuesto **17** sobre la producción de TNF- α inducida por
LPS (10 ng/ml) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)
10 humanas.

Fig. 4. Efecto del compuesto **17** sobre la producción de TNF- α inducida por
LPS (10 ng/ml) en monocitos humanos aislados de sangre periférica.

15 Fig. 5. Inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS (100 ng/ml) en células THP-1 por el compuesto **17** y cálculo de la IC₅₀ (4,49 μ M) en células THP-1.

Fig. 6. Inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS (10 ng/ml) en
20 PBMCs humanos por el compuesto **17** y cálculo de la IC₅₀ (2,65 μ M) en PBMCs.

Fig. 7. Inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS (10 ng/ml) en
monocitos (leucocitos CD14+) humanos por el compuesto **17** y cálculo de la
25 IC₅₀ (2,01 μ M) en monocitos aislados.

Fig. 8. Análisis del efecto de la administración “in vivo” del compuesto **17**.

Fig. 9. Inhibición de la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8
30 e IL-6 en la línea celular THP-1 por el compuesto **17**.

Fig. 10. Inhibición de la producción de las adipocitoquinas IL-6 y leptina en adipocitos humanos maduros generados *in vitro* a partir de precursores mesenquimales de tejido adiposo por el compuesto **17**.

- 5 Fig. 11. Inhibición de la transcripción de TNF- α por el compuesto **17** en PBMCs y en monocitos humanos.

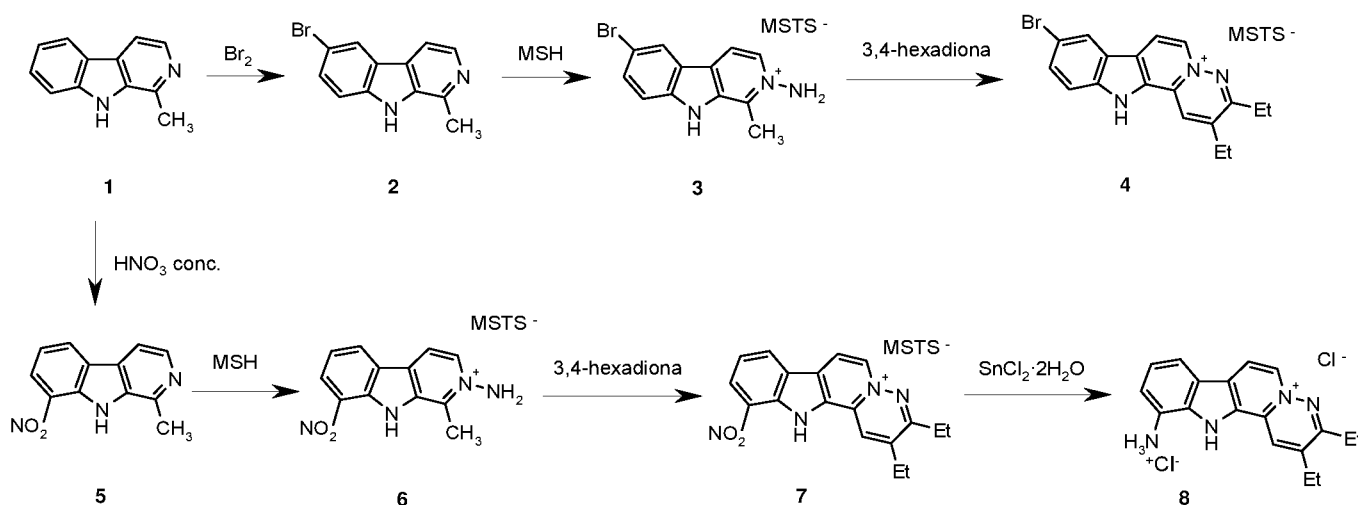
Fig. 12. Inhibición de la actividad NF κ B por el compuesto **17**.

10 EJEMPLOS

Los compuestos de esta invención que han sido publicados, se han preparado según los procedimientos descritos anteriormente para ellos (Fontana, A.; Benito, E. J.; Martín, M. J.; Sánchez, N.; Alajarín, R.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J.; Lambel-Giraudet, S.; Leonce, S.; Pierré, A.; Caignard, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *11*, 2611-2614; Pastor, J.; Siro, J. G.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Rodrigo, M. M.; Ballesteros, M.; Álvarez-Builla, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 3043-3048; Siro, J. G.; Pastor, J.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J.; Gago, F.; de Pascual-Teresa, B.; Pastor, M.; Rodrigo, M. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5476-5483; Siro, J. G.; Pastor, J.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J. J.; Álvarez-Builla, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 19229-1936; Enrique J. Benito Molinero, Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá, 2004). Para otros compuestos, se han aplicado procedimientos similares a los descritos en esta invención.

25

Esquema 1. Proceso de síntesis de los compuestos 2 a 8.



Ejemplo 1. Preparación de 6-bromo-1-metilpirido[3,4-b]indol (Compuesto 2, Esquema 1)

- 5 A una disolución de harmano **1** (0,20 g; 1,1 mmol) en THF (tetrahidrofurano) (10 mL), se añade bromo (0,70 g; 4,4 mmol) con agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se adiciona una alícuota de tiosulfato sódico (10 %; 10 mL), se basifica la mezcla con hidróxido amónico concentrado, se extrae y se lava con diclorometano (3 x 10 mL). La
- 10 fase orgánica se concentra, purificándose el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente una mezcla diclorometano:metanol (10:1). Se aísla el producto como un sólido verde (0,19 g; 66%).

P. f. = 224-226 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 8,19 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz); 8,15 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz); 7,68 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz); 7,55 (dd, 1H, *J* = 8,7 Hz, *J* = 1,9 Hz); 7,37 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz); 2,74 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CDCl₃): δ 142,1; 139,2; 137,0; 135,0; 130,7; 127,0; 124,1; 123,0; 113,1; 112,8; 112,0; 19,2 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3141; 3051; 2954; 2865; 1621; 1569; 1492; 1439; 1406; 1272; 1247; 977; 821; 800; 607 cm⁻¹.

20

Ejemplo 2. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-6-bromo-1-metilpirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 3, Esquema 1)

Sobre una disolución de **2** (0,26 g; 1 mmol) en diclorometano (10 mL), con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una

disolución de O-mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (0,30 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL). Al cabo de 1 hora, se añade éter dietílico para facilitar la precipitación de la sal formada. Se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y acetona (2 x 5 mL), recristalizándose posteriormente en etanol. Se obtiene el producto como un sólido amarillo (0,38 g; 80%).

P. f. = 253-255 °C. ^1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 12,91 (s, 1H, NH); 8,71 (d, 1H, J = 1,8 Hz); 8,54 (s, 2H, NH); 7,89-7,81 (m, 3H); 7,70 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 3,0 Hz); 6,70 (s, 2H); 2,98 (s, 3H); 2,46 (s, 6H); 2,13 (s, 3H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3258; 3151; 3082; 1638; 1484; 1451; 1281; 1166; 1088; 1016; 808; 681 cm^{-1} .

Ejemplo 3. Preparación de mesitilensulfonato de 8-bromo-2,3-dietil-11H-piridazino[1',6':1,2] pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 4, Esquema 1)

A una disolución de **3** (0,24 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL), se añade 3,4-hexadiona (0,07 g; 0,6 mmol) y TEA (triethylamina) (0,06 g; 0,6 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 horas y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna en gel de sílice empleando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). Se obtiene un sólido amarillo (0,17 g; 62%).

P. f. = 216-218 °C. ^1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 13,67 (s, 1H, NH); 9,27 (d, 1H, J = 7,3 Hz); 8,99 (s, 1H); 8,90 (d, 1H, J = 6,9 Hz); 8,83 (s, 1H); 7,87 (s_{ap} , 2H); 6,70 (s, 2H); 3,17 (c, 2H, J = 7,4 Hz); 3,01 (c, 2H, J = 7,0 Hz); 2,46 (s, 6H); 2,13 (s, 3H); 1,44 (t, 3H, J = 7,0 Hz); 1,40 (t, 3H, J = 7,0 Hz) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; CDCl_3 + CD_3OD): δ 163,7; 154,0; 143,4; 142,4; 140,5; 136,4; 135,9; 132,5; 130,7; 130,6; 129,9; 128,9; 125,0; 124,3; 121,6; 117,3; 115,0; 114,0; 25,9; 23,9; 22,7; 20,3; 11,2; 10,4 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3412; 2968; 2932; 1638; 1566; 1521; 1450; 1324; 1283; 1226; 1160; 1084; 1008; 675 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3\text{SBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$; C: 56,45; H: 5,61; N: 7,32; encontrado: C: 56,12; H: 5,47; N: 7,87.

Ejemplo 4. Preparación de 1-metil-8-nitropirido[3,4-b]indol (Compuesto 5, Esquema 1)

Sobre ácido nítrico concentrado 60% (12 mL) se adiciona harmano **1** (0,91 g; 5 mmol) manteniendo la temperatura a 0 °C, y agitación vigorosa durante 2 horas, tras las cuales, se aumenta la temperatura hasta disolver la suspensión blanca, manteniendo la agitación 30 minutos más. Se añade agua/hielo a la suspensión y se basifica con carbonato potásico, filtrando el precipitado sólido obtenido. Tras cromatografiar en columna de sílica gel empleando como eluyente una mezcla diclorometano:metanol (20:1), se aísla el compuesto como un sólido amarillo (0,37 g; 33%).

P. f. = 215-217 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 9,93 (s, 1H, NH); 8,47-8,42 (m, 3H); 7,82 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz); 7,37 (t_{ap}, 1H, *J* = 8,1 Hz, *J* = 7,7 Hz); 2,89 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CDCl₃ + CD₃OD): δ 142,9; 139,5; 134,4; 133,4; 132,6; 129,1; 127,4; 125,6; 124,3; 119,3; 112,8; 19,7 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3378; 3091; 1635; 1574; 1475; 1430; 1340; 1305; 1266; 1205; 1180; 803; 737 cm⁻¹.

Ejemplo 5. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-1-metil-8-nitropirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 6, Esquema 1)

Sobre una disolución de **5** (0,22 g; 1 mmol) en diclorometano (10 mL), con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de MSH (0,30 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL). Al cabo de 1 hora, se añade éter dietílico para facilitar la precipitación total de la sal aminada formada. Se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y acetona (2 x 5 mL), recristalizándose posteriormente en etanol. Se obtiene un sólido amarillo (0,36 g; 82%).

P. f. = 289-291 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CD₃OD): δ 8,80 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 8,70 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 8,63-8,54 (m, 2H); 7,64 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz); 6,80 (s, 2H); 3,24 (s, 3H); 2,57 (s, 6H); 2,19 (s, 3H) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3229; 3090; 1689; 1624; 1523; 1486; 1390; 1310; 1289; 1181; 1086; 1015; 845; 748; 680 cm⁻¹.

Ejemplo 6. Preparación de mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12H-11-nitropiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 7, Esquema 1)

A una disolución de **6** (0,22 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL), se añade 3,4-hexadiona (0,07 g; 0,6 mmol) y TEA (0,06 g; 0,6 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 horas, se concentra a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando
 5 como eluyente una mezcla diclorometano:metanol (10:1). Se obtiene un sólido amarillo (0,10 g; 40%).

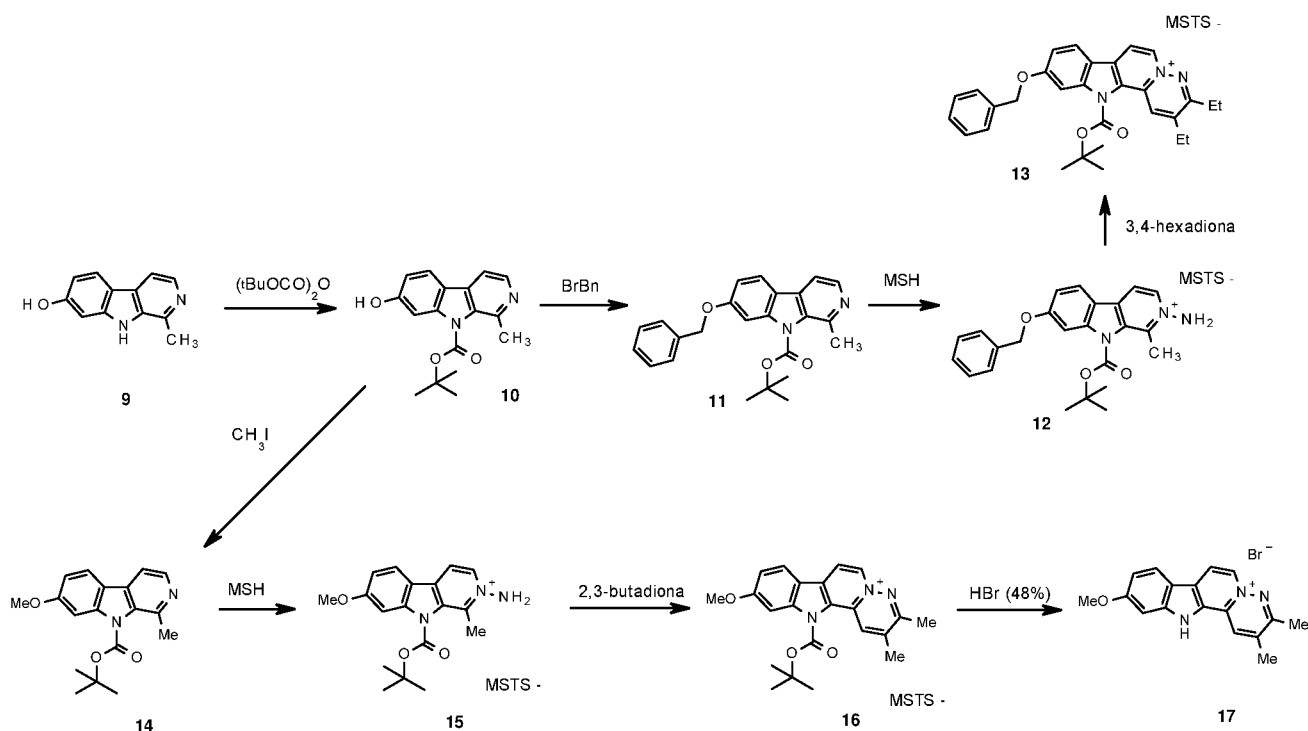
P. f. = 198-200 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CD₃OD): δ 9,60 (s, 1H); 9,13 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz); 8,84-8,78 (m, 2H); 8,68 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,63 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz); 6,86 (s, 2H); 3,22 (c, 2H, *J* = 7,0 Hz); 3,08 (c, 2H, *J* = 7,0 Hz); 2,58 (s, 6H); 2,20
 10 (s, 3H); 1,60 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz); 1,52 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz; CD₃OD): δ 164,7; 155,6; 144,7; 136,9; 136,6; 134,5; 132,8; 132,6; 132,0; 131,5; 130,6; 127,2; 126,6; 125,3; 122,0; 118,8; 118,2; 108,7; 26,9; 25,1; 23,7; 21,1; 13,1; 11,7 ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3126; 2976; 2938; 1687; 1617; 1566; 1468; 1425; 1317; 1252; 1206; 1177; 1104; 801; 738 cm⁻¹. Análisis elemental:
 15 Calculado para C₂₇H₂₈N₄O₅S·2H₂O; C: 58,26; H: 5,80; N: 10,07; encontrado: C: 57,73; H: 5,72; N: 10,40.

Ejemplo 7. Preparación de dicloruro de 11-amonio-2,3-dietil-12H-piridazino[1',6':1,2] pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 8, Esquema 1)

20 Una suspensión de **7** (0,10 g; 0,2 mmol), SnCl₂·2H₂O (0,2 g; 0,8 mmol) y HCl (35%, 0,5 mL) en agua (2 mL), se calienta a reflujo durante 2 horas, tras lo cual, se añade a la mezcla HCl (35%, 0,2 mL). El precipitado obtenido se filtra y se lava sucesivamente con HCl (10%, 1 mL) y éter dietílico (2 x 10 mL). Se obtiene el producto como un sólido amarillo (0,05 g; 71%).

25 P. f. = 266-268 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9,24 (s, 1H); 9,05 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,70 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 7,70 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,21 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz); 6,98 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz); 4,25 (s_{ap}, 3H, NH); 3,11 (c, 2H, *J* = 7,4 Hz); 2,95 (c, 2H, *J* = 7,0 Hz); 1,46 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz); 1,38 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3420; 1627; 1554; 1483; 1414; 1338; 1253; 1238; 1210; 1011; 821;
 30 749 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₁₈H₁₉N₄Cl₂·3H₂O; C: 51,58; H: 6,28; N: 13,43; encontrado: C: 52,16; H: 6,08; N: 12,78.

Esquema 2.- Proceso de síntesis de los compuestos 10 a 17.



5 Ejemplo 8. Preparación de 9-N-Boc-harmol (Compuesto 10, Esquema 2)

Sobre una disolución de harmol **9** (1 g; 5 mmol) en diclorometano (50 mL), se adiciona sucesivamente carbonato de di-terbutilo (2,18 g; 10 mmol), TEA (0,50 g; 5 mmol) y DMAP (4-dimetilaminopiridina) (0,61 g; 5 mmol). Tras dejar la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, se elimina el

10 disolvente a vacío, sin llegar a sequedad (20 mL), lavando la mezcla con agua (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 anhidro, se concentra a sequedad, purificando el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente diclorometano:metanol (20:1). Se aísla el compuesto como un sólido blanco (1,14 g; 77 %).

15 P. f. = 167-169 °C. ^1H -RMN (300 MHz; CDCl_3): δ 9,16 (s, 1H); 8,29 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz); 7,70 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,51 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); 7,18 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz); 6,97 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,0$ Hz); 2,73 (s, 3H); 1,63 (s, 9H) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; CDCl_3): δ 153,0; 150,7; 141,7; 140,8; 138,0; 135,4; 127,3; 122,0; 119,4; 113,3; 112,6; 104,5; 84,7; 27,6; 20,4 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3135;

20 3066; 2982; 2884; 1755; 1637; 1571; 1450; 1373; 1323; 1282; 1251; 1233;

1146; 949; 897; 749 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$; C: 68,43; H: 6,08; N: 9,39; encontrado C: 67,99; H: 6,11; N: 8,92.

Ejemplo 9. Preparación de 7-benciloxi-9-*terc*-butoxicarbonil-1-metilpirido[3,4-*b*]indol (Compuesto 11, Esquema 2)

A una suspensión de **10** (0,30 g; 1 mmol), hidróxido potásico pulverizado (0,07 g; 1,2 mmol), carbonato potásico anhidro (0,17 g; 1,2 mmol) y dicloruro de bis(*N,N'*-bencil-*N,N'*-dietil)-*N,N'*-(oxidi-2,1-etanodiil)diamonio (BBDE-Cl) (0,02 g; 0,05 mmol) en acetonitrilo seco (50 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se adiciona bromuro de bencilo (BrBn) (0,20 g; 1,2 mmol). La suspensión resultante se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se filtra la suspensión y se lavan las sales con acetonitrilo. Las aguas de filtrado y lavado se concentran a sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). El producto se obtiene como un sólido amarillo pálido (0,30 g; 77 %).

P. f. = 180-182 °C. ^1H -RMN (300 MHz; CDCl_3): δ 8,33 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz); 8,10 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 7,82 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz); 7,29-7,22 (m, 3H); 7,16 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,11 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 2,0$ Hz); 6,99-6,95 (m, 2H); 5,73 (s, 2H); 2,84 (s, 3H); 1,60 (s, 9H) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; CDCl_3): δ 151,7; 151,5; 142,2; 141,5; 138,6; 137,5; 136,0; 128,9; 128,7; 127,4; 125,2; 122,0; 118,9; 114,1; 112,7; 102,2; 83,5; 48,2; 27,6; 23,0 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3416; 2981; 1752; 1625; 1442; 1407; 1371; 1320; 1284; 1248; 1154; 1136; 817; 721; 649 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$; C: 74,21; H: 6,23; N: 7,21; encontrado C: 73,85; H: 6,17; N: 7,44.

Ejemplo 10. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-7-benciloxi-9-*terc*-butoxicarbonil-1-metilpirido[3,4-*b*]indol-2-inio (Compuesto 12, Esquema 2)

Sobre una disolución de **11** (0,38 g; 1 mmol) en éter dietílico (10 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una

disolución de MSH (0,30 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL). Al cabo de una hora, se añade éter dietílico para facilitar la precipitación total de la sal aminada formada. Se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y éter dietílico (2 x 5 mL), obteniéndose el producto como un sólido de color blanco (0,50 g; 84%).

P. f. = 166-168 °C (desc.). ^1H -RMN (300 MHz; CD_3OD): δ 8,53 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,44 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,41 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,54 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz); 7,33-7,28 (m, 4H); 7,02 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 6,79 (s, 2H); 5,92 (s, 2H); 3,03 (s, 3H); 2,57 (s, 6H); 2,18 (s, 3H); 1,52 (s, 9H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3420; 3285; 3157; 3064; 2978; 1758; 1630; 1449; 1370; 1324; 1276; 1251; 1209; 1180; 1156; 1135; 1085; 1015; 849; 678 cm^{-1} .

Ejemplo 11. Preparación de mesitilensulfonato de 10-benciloxi-12-terc-butoxicarbonil-2,3-dietilpiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio

(Compuesto 13, Esquema 2)

A una disolución de **12** (0,30 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL) se añade 3,4-hexadiona (0,07 g; 0,6 mmol) y acetato sódico anhidro (0,05 g; 0,6 mmol). Tras 30 minutos a reflujo, se adiciona nuevamente a la mezcla 3,4-hexadiona (0,5 mmol) y acetato sódico anhidro (0,04 g; 0,5 mmol), dejando finalmente la mezcla a reflujo durante 2 horas, tras las cuales se concentra a sequedad y el residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). Se obtiene un sólido amarillo (0,23 g; 63%).

P. f. = 183-185 °C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$): δ 8,82 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,69 (s, 1H); 8,67 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz); 8,35 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz); 7,51 (s, 1H); 7,26-7,13 (m, 6H); 6,57 (s, 2H); 6,42 (s, 2H); 2,97 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz); 2,84 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz); 2,47 (s, 6H); 2,11 (s, 3H); 1,59 (s, 9H); 1,40 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz); 1,09 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$): δ 163,1; 153,6; 151,1; 145,2; 142,7; 139,2; 138,2; 136,6; 134,6; 131,6; 130,2; 130,0; 129,4; 127,6; 125,2; 125,1; 123,3; 123,2; 117,6; 117,1; 116,1; 112,7; 103,3; 84,2; 49,1; 27,4; 26,1; 24,2; 22,4; 20,4; 11,0; 10,2 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3408; 2978; 2934; 1758; 1622; 1574; 1451; 1411; 1337; 1139; 1086; 1014; 809; 678

cm⁻¹. Análisis Elemental para C₃₉H₄₃N₃O₆S·3H₂O; C: 63,65; H: 6,71; N: 5,71; encontrado C: 63,76; H: 6,47; N: 5,84.

Ejemplo 12. Preparación de 9-*terc*-butoxicarbonil-1-metil-7-metoxipirido[3,4-*b*]indol (Compuesto 14, Esquema 2)

A una suspensión de **10** (0,30 g; 1 mmol), hidróxido potásico pulverizado (0,07 g; 1,2 mmol), carbonato potásico anhidro (0,17 g; 1,2 mmol) y BBDE-Cl (0,02 g; 0,05 mmol) en acetonitrilo seco (50 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se adiciona yodometano (0,17 g; 1,2 mmol). La suspensión resultante se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se filtra la suspensión y se lavan las sales con acetonitrilo. Las aguas de filtrado y lavado se concentran a sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). El producto se obtiene como un sólido amarillo pálido (0,20 g; 65%).
P. f. = 133-135 °C. ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 8,23 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz); 7,98 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 7,70 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz); 7,19 (s, 1H); 7,00 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz); 4,06 (s, 3H); 2,95 (s, 3H); 1,64 (s, 9H) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3412; 2979; 2929; 1755; 1624; 1450; 1408; 1370; 1248; 1148; 1136; 819 cm⁻¹. Análisis Elemental para C₁₈H₂₀N₂O₃ C: 69,22; H: 6,45; N: 8,97; encontrado C: 68,93; H: 6,37; N: 9,12.

Ejemplo 13. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-9-*terc*-butoxicarbonil-1-metil-7-metoxipirido[3,4-*b*]indol-2-inio (Compuesto 15, Esquema 2)

Sobre una disolución de **14** (0,30 g; 1 mmol) en éter dietílico (10 mL) con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de MSH (0,30 g; 1,4 mmol) en diclorometano (5 mL). Al cabo de una hora, se añade éter dietílico para facilitar la precipitación total de la sal aminada formada. Se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano (2 x 5 mL) y éter dietílico (2 x 5 mL), obteniéndose el producto como un sólido de color blanco (0,46 g; 88%).

P. f. = 157-159 °C (desc.). ^1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 8,78 (d, 1H, J = 6,7 Hz); 8,49 (d, 1H, J = 6,6 Hz); 8,34 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,94 (s, 2H, NH); 7,60 (d, 1H, J = 2,0 Hz); 7,23 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 2,2 Hz); 6,71 (s, 2H); 3,94 (s, 3H); 2,82 (s, 3H); 2,47 (s, 6H); 2,14 (s, 3H); 1,69 (s, 9H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3418; 2983; 1747; 1619; 1457; 1356; 1261; 1209; 1144; 1097; 835; 685 cm^{-1} .

Ejemplo 14. Preparación de mesitilensulfonato de 12-*terc*-butoxicarbonil-2,3-dimetil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 16, Esquema 2)

10 A una disolución **15** (0,27 g; 0,5 mmol) en etanol (20 mL), se añade 2,3-butanodiona (0,05 g; 0,6 mmol) y acetato sódico anhidro (0,05 g; 0,6 mmol). Tras 30 minutos a reflujo, se adiciona nuevamente a la mezcla 2,3-butanodiona (0,5 mmol) y acetato sódico anhidro (0,04 g; 0,5 mmol), dejando finalmente la mezcla 2 horas a reflujo, tras las cuales se concentra a sequedad la mezcla, purificando el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente diclorometano:metanol (10:1). El producto se obtiene como un sólido amarillo (0,11 g; 40%).

15 P. f. = 160-162 °C (desc.). ^1H -RMN (300 MHz; CDCl_3 + CD_3OD): δ 9,10 (s, 1H); 8,80 (d, 1H, J = 7,0 Hz); 8,57 (d, 1H, J = 7,0 Hz); 8,29 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,48 (s, 1H); 7,17 (d, 1H, J = 8,4 Hz); 6,75 (s, 2H); 3,96 (s, 3H); 2,74 (s, 3H); 2,69 (s, 3H); 2,52 (s, 6H); 2,15 (s, 3H); 1,58 (s, 9H) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; CDCl_3 + CD_3OD): δ 161,6; 153,4; 149,8; 144,8; 141,2; 137,4; 135,3; 131,2; 130,2; 129,7; 129,5; 128,2; 127,1; 125,9; 123,8; 117,2; 116,8; 112,7; 103,1; 84,7; 55,5; 27,2; 23,0; 20,6; 19,9; 19,7; 19,3; 18,4 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3408; 2979; 2927; 1758; 1624; 1556; 1458; 1370; 1311; 1252; 1184; 1124; 1012; 849; 670 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{SO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ C: 62,49; H: 6,26; N: 7,05; encontrado C: 62,37; H: 6,11; N: 7,11.

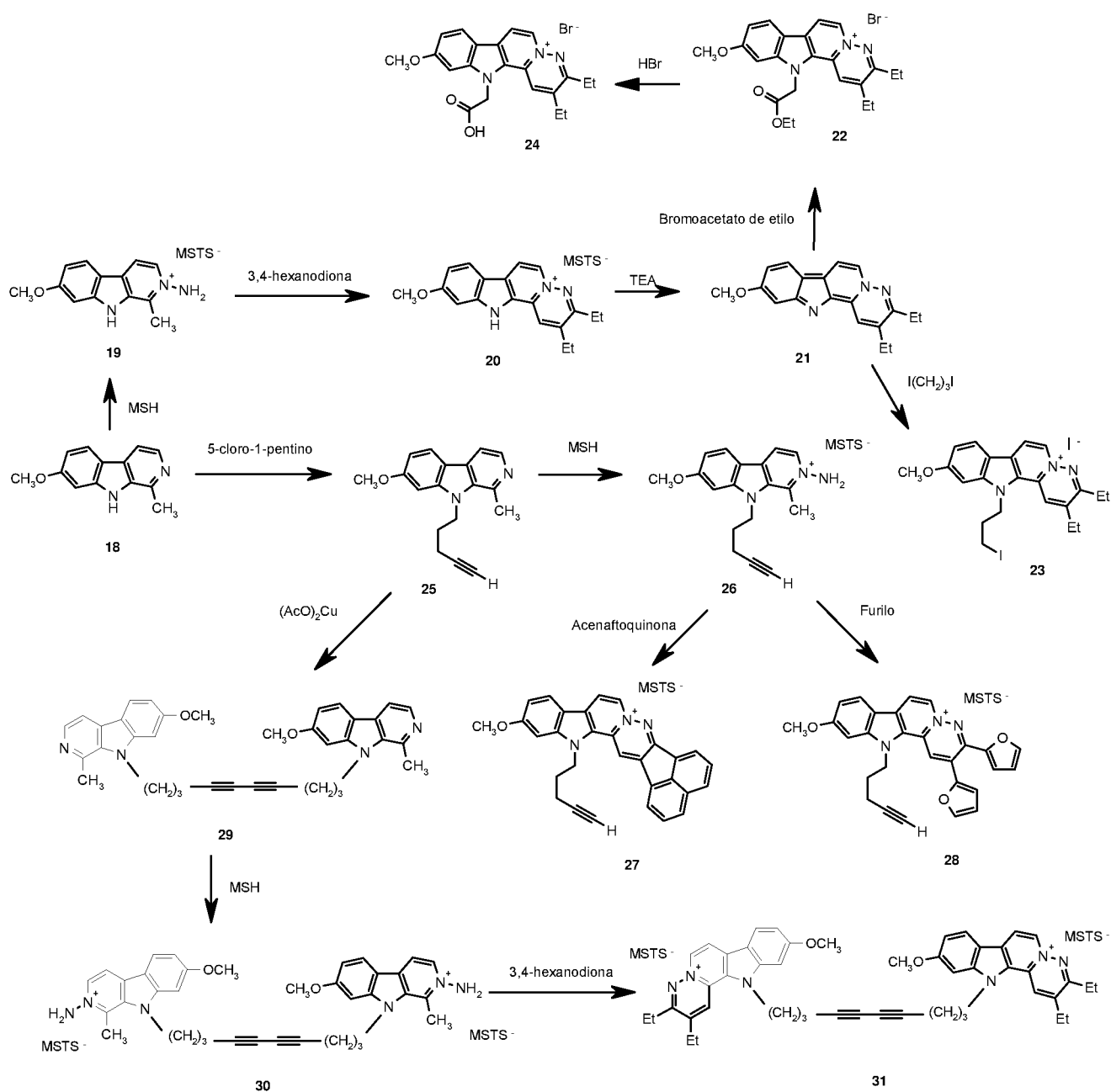
Ejemplo 15. Preparación de bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 17, Esquema 2)

30 Una suspensión formada por **16** (0,11 g; 0,2 mmol) y ácido bromhídrico concentrado (1 mL) en acetona (10 mL) se lleva a reflujo durante 2 horas. Al

cabo de dicho tiempo, la suspensión resultante se filtra en caliente, lavando el sólido obtenido con acetona (2 x 10 mL). El producto se obtiene como un sólido anaranjado (0,065 g; 91%).

P. f. = 204-206 °C. ^1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 13,33 (s, 1H); 9,18 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,92 (s, 1H); 8,77 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz); 8,39 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,24 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,11 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,2$ Hz); 3,95 (s, 3H); 2,75 (s, 3H); 2,62 (s, 3H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3419; 2984; 1627; 1482; 1445; 1410; 1332; 1274; 1200; 1165; 1094; 1023; 812; 682 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{OBr} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ C: 54,26; H: 4,82; N: 11,17; encontrado C: 54,38; H: 5,03; N: 10,94.

Esquema 3.- Proceso de síntesis de los compuestos 19 a 31.



Ejemplo 16. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-1-metil-7-metoxi-9H-pirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 19, Esquema 3)

- 5 A una disolución de harmina comercial **18** (0,20 g; 0,94 mmol) en diclorometano (5 mL), con agitación y a temperatura ambiente, se adiciona gota a gota, otra disolución de O-mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (0,41 g; 1,32 mmol) en diclorometano (2 mL). La mezcla se deja con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, tras lo cual se añade éter etílico a la

suspensión resultante. El sólido obtenido se filtra y se lava sucesivamente con diclorometano y acetona. Se obtiene un sólido blanco (0,37 g; 92%).

P. f. = 234-235 °C (*Lit.* 235-237 °C).

5 **Ejemplo 17. Preparación de mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol-5-inio (Compuesto 20, Esquema 3)**

Sobre una suspensión de **19** (0,15 g; 0,35 mmol) en etanol (5 mL), se añade 3,4-hexanodiona (0,04 g; 0,35 mmol) y acetato sódico anhidro (0,03 g; 0,35
10 mmol). Tras 24 horas a reflujo, y posterior triturado del aceite con una mezcla de acetona-éter etílico, se filtra el sólido así obtenido, lavándose éste posteriormente con acetona en caliente. Se recrystaliza en ácido acético-acetona y se obtiene un sólido amarillo pálido (0,10 g; 56%).

P. f. = 253-254 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 12,87 (s, 1H); 9,12 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,91 (s, 1H); 8,72 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz); 8,34 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz); 7,22 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz); 7,07 (dd, 1H, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,8 Hz); 3,93 (s, 3H); 3,10 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 2,95 (c, 2H, *J* = 7,3 Hz); 1,42 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz); 1,37 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 2979; 2940; 1630; 1569; 1460; 1412; 1336; 1225; 1167; 1087; 1016; 813; 678 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para
20 C₂₈H₃₁N₃O₄S·1/2H₂O; C: 65,35; H: 6,27; N: 8,16; encontrado: C: 65,07; H: 6,44; N: 7,90.

Ejemplo 18. Preparación de 2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-*b*]indol (Compuesto 21, Esquema 3)

25 Una suspensión de **20** (0,10 g; 0,2 mmol) en agua (5 mL) se trató con trietilamina en exceso a temperatura ambiente. Inmediatamente, la suspensión cambió a una coloración más oscura e intensa. Tras 1 hora con agitación a temperatura ambiente, el sólido en suspensión se filtra, se lava con agua, hasta que las aguas dejan de ser básicas, y se seca a vacío, obteniéndose la
30 anhidrobase como un sólido rojo-anaranjado (0,055 g; 90%).

P. f. = 191-193 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9,12 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz); 8,91 (s, 1H); 8,72 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz); 8,34 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz); 7,22 (d, 1H, *J* =

2,0 Hz); 7,07 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,4$ Hz); 3,93 (s, 3H); 3,10 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz); 2,95 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz); 1,42 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz); 1,37 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz) ppm. IR (ν_{\max} , KBr): 2971; 2935; 1618; 1565; 1462; 1410; 1319; 1201; 1159; 1124; 1085; 1030; 771 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$; C: 74,73; H: 6,27; N: 13,26; encontrado: C: 74,40; H: 6,49; N: 13,01.

Ejemplo 19. Preparación de bromuro de 2,3-dietil-12-etoxicarbonilmetil-10-metoxi piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 22, Esquema 3)

10 A una suspensión de **21** (0,06 g; 0,2 mmol) en acetonitrilo (5 mL), agitada a temperatura ambiente, se añade gota a gota bromoacetato de etilo (0,17 g; 1 mmol). Transcurridas 24 horas, la suspensión resultante se filtra, obteniendo un sólido, que se lava sucesivamente con acetona (2 x 1 mL) y la mínima cantidad de etanol. Finalmente se recristaliza en una mezcla etanol-éter etílico, y se
15 obtiene un sólido amarillo (0,028 g; 28%).

P. f. = 310 °C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,37 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz); 8,94 (s, 1H); 8,76 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 8,48 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz); 7,69 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz); 7,17 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 1,5$ Hz); 6,02 (s, 2H); 4,23 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz); 3,95 (s, 3H); 3,14 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz); 2,98 (c, 2H, $J = 7,3$ Hz); 1,46-1,25 (m, 9H)
20 ppm. IR (ν_{\max} , KBr): 2974; 2939; 2885; 1742; 1624; 1572; 1519; 1412; 1344; 1273; 1163; 830 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3\text{Br} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$; C: 56,33; H: 5,75; N: 8,57; encontrado: C: 56,14; H: 6,02; N: 8,67.

Ejemplo 20. Preparación de yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 23, Esquema 3)

Una suspensión de **21** (86,8 mg; 0,3 mmol) en 1,3-diiodopropano (5 mL) se irradia en un sintetizador por microondas durante dos periodos de 10 minutos con una potencia de 300 vatios, apareciendo un precipitado el cual se filtra en caliente y se lava sucesivamente con acetona (2 x 5 mL) y éter dietílico (2 x 5 mL). El precipitado formado se recristaliza en etanol, obteniéndose un sólido
30 naranja (96 mg; 55 %).

P. f. > 300 °C. ^1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 9,18 (d, 1H, J = 7,0 Hz); 9,04 (d, 1H, J = 7,0 Hz); 8,87 (s, 1H); 8,37 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,20 (s, 1H); 7,08 (d, 1H, J = 9,0 Hz); 5,19 (s_{ap.}, 2H); 3,94 (s, 3H); 3,35 (s_{ap.}, 2H); 2,97 (c, 2H, J = 7,2 Hz); 2,90 (c, 2H, J = 7,2 Hz); 2,59 (s_{ap.}, 2H); 1,40 (t, 6H, J = 7,0 Hz) ppm.

5

Ejemplo 21. Preparación de bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxi-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio (Compuesto 24, Esquema 3)

Una mezcla de **22** (38,7 mg; 0,08 mmol) y HBr (48%, 1 mL) se calienta a reflujo durante 3 horas. A continuación, la mezcla de reacción se deja enfriar y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se tritura en éter dietílico, proporcionando un sólido naranja (30,9 mg; 85%).

P. f. = 234-235 °C. ^1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 9,33 (d, 1H, J = 6,8 Hz); 8,90 (d, 1H, J = 6,8 Hz); 8,58 (s, 1H); 8,47 (d, 1H, J = 8,9 Hz); 7,68 (s, 1H); 7,17 (d, 1H, J = 8,7 Hz); 5,96 (s, 2H); 3,97 (s, 3H); 3,15 (c, 2H, J = 7,2 Hz); 2,99 (c, 2H, J = 7,2 Hz); 1,39 (t_{ap.}, 6H, J = 6,8 Hz) ppm.

Ejemplo 22. Preparación de 1-metil-7-metoxi-9-(pent-4-inil)pirido[3,4-b]indol (Compuesto 25, Esquema 3)

Una mezcla de harmina **18** (1,06 g; 5 mmol), 5-cloro-1-pentino (0,72 g; 7 mmol), BBDE-Cl como catalizador de transferencia de fase (0,11 g; 0,25 mmol), hidróxido potásico pulverizado seco (0,50 g; 9 mmol), y carbonato potásico anhidro (1,24 g; 9 mmol) en acetonitrilo seco (50 mL); se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 400 horas. La suspensión resultante se filtra, lavando el residuo insoluble con acetonitrilo (3 x 10 mL). Los filtrados se concentraron a sequedad, el residuo se purifica mediante cromatografía en columna de sílica gel utilizando AcOEt (Acetato de etilo) como eluyente. El producto se recrystaliza en hexano, obteniendo un sólido blanco (0,84 g, 61%).

P. f. = 107-109 °C. ^1H -RMN (300 MHz; CDCl₃): δ 8,29 (d, 1H, J = 5,1 Hz); 7,97 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,73 (d, 1H, J = 5,1 Hz); 6,99 (d, 1H, J = 2,2 Hz); 6,89 (dd, 1H, J = 8,4 Hz, J = 2,2 Hz); 4,64 (t, 2H, J = 7,7 Hz); 3,95 (s, 3H); 3,03 (s, 3H); 2,32 (td, 2H, J = 6,6 Hz, J = 2,5 Hz); 2,13 (t, 1H, J = 2,5 Hz); 2,11-2,01 (m, 2H)

ppm. IR (ν_{\max} , KBr): 3172; 2982; 2103; 1621; 1565; 1449; 1407; 1244; 1162; 1047; 809 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$; C: 77,67; H: 6,52; N: 10,06; encontrado: C: 77,30; H: 6,67; N: 9,92.

5 Ejemplo 23. Preparación de mesitilensulfonato de 2-amino-1-metil-7-metoxi-9-(pent-4-inil)pirido[3,4-b]indol-2-inio (Compuesto 26, Esquema 3)

A una disolución de **25** (0,26 g; 1 mmol) en diclorometano (5 mL), con agitación constante y a temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de O-mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (1,4 mmol), en diclorometano (2
10 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras los cuales se añade éter dietílico a la mezcla para precipitar la sal formada. El sólido se filtra y lava sucesivamente con acetona y diclorometano. Se recrystaliza en etanol obteniéndose un sólido amarillo (0,43 g; 88%).

P. f. = 201-202 °C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,54 (d, 1H, J = 6,9 Hz);
15 8,43 (d, 1H, J = 6,6 Hz); 8,30 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,67 (s, 2H); 7,37 (d, 1H, J = 2,2 Hz); 7,06 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 2,2 Hz); 4,72 (t, 2H, J = 7,7 Hz); 3,95 (s, 3H); 3,15 (s, 3H); 2,97 (t, 1H, J = 2,5 Hz); 2,31 (td, 2H, J = 6,8 Hz, J = 2,5 Hz); 2,00-1,94 (m, 2H) ppm. IR (ν_{\max} , KBr): 3264; 3191; 3086; 2971; 1622; 1578; 1452; 1233; 1205; 1009; 827; 676 cm^{-1} . Análisis Elemental para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$;
20 C: 65,70; H: 6,33; N: 8,51; encontrado C: 65,33; H: 6,50; N: 8,26.

Ejemplo 24. Preparación de mesitilensulfonato de 14-metoxi-16-(pent-4-inil)acenafto[1'',2'':3',4']piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-9-inio (Compuesto 27, Esquema 3)

25 Una mezcla de **26** (0,10 g; 0,2 mmol), acenaftoquinona (0,036 g; 0,2 mmol), acetato sódico anhidro (0,016 g; 0,2 mmol) y etanol (10 mL), se calienta a reflujo durante 1 hora. El sólido obtenido se filtra en caliente, lavándose sucesivamente con etanol caliente (5 mL) y acetona caliente (5 mL). Finalmente se recrystaliza en acetona-ácido acético. Se obtiene un sólido
30 anaranjado (0,085 g; 67%).

P. f. = 273-274 °C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,55 (s, 1H); 9,37 (d, 1H, J = 6,9 Hz); 8,75 (d, 1H, J = 6,9 Hz); 8,71 (d, 1H, J = 6,9 Hz); 8,58 (d, 1H, J = 7,3

Hz); 8,38 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 8,34 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz); 8,02 (t_{ap} , 2H, $J = 7,4$ Hz); 7,52 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,18 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,2$ Hz); 5,24 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz); 4,05 (s, 3H); 2,75 (s, 1H); 2,54-2,51 (m, 2H); 2,38-2,29 (m, 2H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 2932; 1621; 1574; 1544; 1409; 1250; 1223; 1161; 829; 678 cm^{-1} .

- 5 Análisis Elemental para $C_{39}H_{33}N_3O_4S \cdot 2H_2O$; C: 69,31; H: 5,52; N: 6,22; encontrado C: 69,07; H: 5,19; N: 5,91.

Ejemplo 25. Preparación de mesitilensulfonato de 2,3-di-(2-furil)-10-metoxi-12-(pent-4-inil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio

10 **(Compuesto 28, Esquema 3)**

Una mezcla de **26** (0,10 g; 0,2 mmol), furilo (0,04 g; 0,2 mmol) y acetato sódico anhidro (0,016 g; 0,2 mmol) en etanol (10 mL) se calentó a reflujo durante 5 horas. La disolución resultante se concentró a sequedad y el residuo se trituró con acetona-éter dietílico. El sólido así obtenido, se filtró y se lavó sucesivamente con éter dietílico, agua y acetona. Se obtuvo un sólido color ocre (0,04 g; 43%).

- 15 P. f. = 279-280 °C. 1H -RMN (300 MHz; CD_3OD): δ 9,27 (s, 1H); 9,19 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz); 8,75 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,36 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,95 (d, 1H, $J = 1,1$ Hz); 7,91 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz); 7,51 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,20 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,1$ Hz); 7,18 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz); 6,81 (dd, 1H, $J = 3,6$ Hz, $J = 1,8$ Hz); 6,73 (dd, 1H, $J = 3,6$ Hz, $J = 1,8$ Hz); 6,58 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz); 5,14 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 4,05 (s, 3H); 2,50 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz); 2,47 (td, 2H, $J = 6,6$ Hz, $J = 2,5$ Hz); 2,34-2,26 (m, 2H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 2957; 1683; 1639; 1621; 1563; 1411; 1210; 1017; 824; 679; 644 cm^{-1} . Análisis Elemental para $C_{37}H_{33}N_3O_6S \cdot 1H_2O$; C: 20 66,75; H: 5,30; N: 6,31; encontrado C: 66,44; H: 5,38; N: 6,25.

Ejemplo 26. Preparación de 1,10-bis-(1-metil-7-metoxipirido[3,4-b]indol-9-il)-deca-4,6-diino (Compuesto 29, Esquema 3)

- 30 Una mezcla de **25** (0,26 g; 1 mmol) y acetato cúprico (0,90 g; 5 mmol) en acetonitrilo (20 mL), se refluje durante 48 horas, se enfría la mezcla de reacción, añadiéndose a la misma agua (10 mL) y amoníaco (25%) (5 mL). La mezcla se extrae con diclorometano (30 mL), la fase orgánica se seca con

sulfato magnésico anhidro y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna en gel de sílice, empleando como eluyente acetona/etanol (8:2 v/v). El producto se recrystalizó en acetona, obteniendo un sólido pálido amarillo (0,12 g; 45 %).

- 5 P. f. = 184-185 °C. ^1H -RMN (300 MHz; CDCl_3): δ 8,29 (d, 2H, $J = 5,5$ Hz); 7,97 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz); 7,74 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz); 6,89 (d, 2H, $J = 2,2$ Hz); 6,89 (dd, 2H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,2$ Hz); 4,64 (t, 4H, $J = 7,3$ Hz); 3,94 (s, 6H); 3,04 (s, 6H); 2,38 (t, 4H, $J = 6,6$ Hz); 2,13-2,04 (m, 4H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 2966; 2115; 1617; 1558; 1414; 1238; 1108; 839; 675 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_2$; C: 77,95; H: 6,18; N: 10,10; encontrado C: 77,71; H: 6,33; N: 9,84.
- 10

Ejemplo 27. Preparación de dimesitilensulfonato de 9,9'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2-amino-1-metil-7-metoxipirido[3,4-b]indol-2-inio)

15 **(Compuesto 30, Esquema 3)**

- A una suspensión de **29** (0,55 g; 1 mmol) en diclorometano (5 mL), con agitación constante y a temperatura ambiente, se añadió gota a gota una disolución de O-mesitilensulfonato de hidroxilamina (MSH) (3 mL) en diclorometano (2 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, añadiéndose éter dietílico para favorecer la precipitación de la sal. El sólido se filtró y se lavó sucesivamente con acetona y diclorometano, recrystalizándose en etanol. Se obtiene un sólido blanco (0,55 g; 90%).
- 20

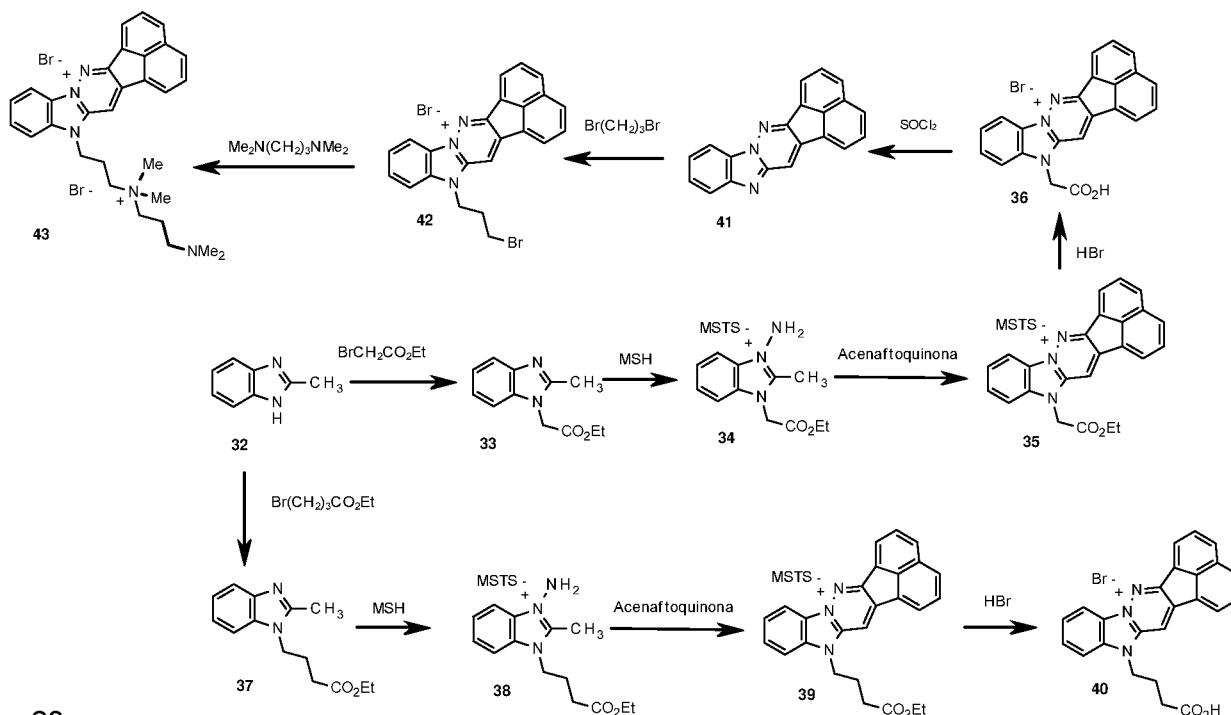
- P. f. = 250-251 °C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,54 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 8,43 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz); 8,30 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz); 7,67 (s, 4H); 7,35 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz); 7,05 (dd, 2H, $J = 8,8$ Hz, $J = 1,8$ Hz); 4,70 (t, 4H, $J = 7,3$ Hz); 3,94 (s, 6H); 3,13 (s, 6H); 2,47-2,43 (m, 4H); 2,02-1,97 (m, 4H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3432; 3252; 3139; 2934; 2328; 1624; 1573; 1456; 1249; 1228; 1167; 1085; 1014; 816; 679 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$; C: 65,83; H: 6,14; N: 8,53; encontrado: C: 65,57; H: 6,22; N: 8,40.
- 25

Ejemplo 28. Preparación de dimesitilensulfonato de 12,12'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio) (Compuesto 31, Esquema 3)

Una mezcla de **30** (0,10 g; 0,1 mmol), 3,4-hexanodiona (0,025 g; 0,2 mmol), acetato sódico anhidro (0,008 g; 0,1 mmol) y etanol (10 mL), se calentó a reflujo durante 24 horas. La disolución resultante se concentró a sequedad, triturándose el residuo en una mezcla acetona-éter dietílico y lavándose con la mínima cantidad de agua fría (1 mL), secándose finalmente a vacío. Se obtiene un sólido (0,06 g; 52%).

- P. f. = 292-293 °C. ^1H -RMN (300 MHz; CD_3OD , CF_3COOD): δ 9,10 (d, 2H, J = 6,6 Hz); 8,73 (s, 2H); 8,64 (d, 2H, J = 6,9 Hz); 8,28 (d, 2H, J = 8,8 Hz); 7,22 (d, 2H, J = 2,5 Hz); 7,13 (dd, 2H, J = 8,8 Hz, J = 2,2 Hz); 5,73 (t, 4H, J = 7,5 Hz); 3,99 (s, 6H); 3,16 (c, 4H, J = 7,3 Hz); 3,05 (c, 4H, J = 7,3 Hz); 2,48-2,45 (m, 4H); 2,25-2,18 (m, 4H); 1,51-1,45 (m, 12H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 2954; 1619; 1558; 1414; 1202; 1178; 1085; 679 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{66}\text{H}_{72}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$; C: 68,37; H: 6,43; N: 7,25; encontrado: C: 68,04; H: 6,69; N: 7,43.

Esquema 4.- Proceso de síntesis de los compuestos 33 a 43.



Procedimiento general para la alquilación de 2-metilbencimidazol

Una mezcla de 2-metilbencimidazol (1,32 g; 10,0 mmol), y el correspondiente haluro de alquilo (10,0 mmol); BBDE-Cl (0,22 g; 0,5 mmol), hidróxido potásico pulverizado (0,56 g; 10,0 mmol), carbonato potásico anhidro (1,38 g; 10,0 mmol) y acetonitrilo seco (100 mL), se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 50 horas. La suspensión resultante se filtra y el residuo insoluble se lava con acetonitrilo caliente (2 x 50 mL). Los filtrados se concentran hasta sequedad, obteniéndose un aceite que se purifica mediante cromatografía en columna de sílica gel, utilizando acetato de etilo como eluyente.

Ejemplo 29. Preparación de (2-metilbencimidazol-1-il)acetato de etilo (Compuesto 33, Esquema 4)

El producto se obtiene como un sólido blanco (1,98 g; 91%). P. f. = 105-106 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 7,36-7,52 (m, 2H); 7,05-7,16 (m, 2H); 5,15 (s, 2H); 4,14 (c, 2H, *J* = 7,1 Hz); 2,44 (s, 3H); 1,20 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 2981; 1734; 1517; 1465; 1407; 1377; 1351; 1216; 1026; 737 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₁₂H₁₄N₂O₂; C: 66,04; H: 6,47; N: 12,84; encontrado: C: 65,93; H: 6,64; N: 12,70.

Ejemplo 30. Preparación de (2-metilbencimidazol-1-il)butanoato de etilo (Compuesto 37, Esquema 4)

Se obtiene el producto como un sólido blanco (2,27 g; 98%). P. f. = 101-102 °C. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 7,49-7,46 (m, 2H); 7,15-7,10 (m, 2H); 4,40 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz); 3,98 (c, 2H, *J* = 7,1 Hz); 2,81 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz); 2,53 (s, 3H); 1,07 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz) ppm. IR (ν_{max}, KBr): 3979; 1720; 1511; 1458; 1401; 1364; 1340; 1209; 1014; 728 cm⁻¹. Análisis elemental: Calculado para C₁₄H₁₈N₂O₂; C: 67,22; H: 6,94; N: 12,06; encontrado: C: 67,13; H: 6,84; N: 12,07.

Procedimiento general para la aminación de benzimidazoles. A una disolución de O-(mesitilenesulfonil)hidroxilamina (MSH) (2,15 g, 10 mmol) en

diclorometano (20 mL) se añadió el correspondiente benzimidazol (10 mmol) en el mismo disolvente (20 mL) gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se añadió éter dietílico (30 mL) para precipitar las sales de *N*-aminobenzimidazolio que se trituraron con éter (3 x 5 mL) y se
5 recristalizaron en etanol absoluto.

Ejemplo 31. Preparación de mesitilensulfonato de 1-amino-3-(etoxicarbonilmetil)-2-metilbenzimidazol-1-io (Compuesto 34, Esquema 4)

Rto = 89%. P.f. = 210-212 °C (sólido blanco). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 7.95 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz); 7.85 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz); 7.65-7.60 (m, 2H); 6.77 (s, 2H, NH₂); 5.57
10 (s, 2H); 4.19 (q, 2H; *J* = 7.3 Hz); 2.81 (s, 3H); 1.22 (t, 3H; *J* = 7.1 Hz). Análisis Elemental para C₂₁H₂₇N₃O₅S: C, 58.18; H, 6.28; N, 9.70. Encontrado: C, 58.10; H, 6.15; N, 9.81.

Ejemplo 32. Preparación de mesitilensulfonato de 1-amino-3-(3-etoxicarbonilpropil)-2-metilbenzimidazol-1-io (Compuesto 38, Esquema 4)

Rto = 79%. P. f. = 106-107 °C (Sólido blanco). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 8.0-7.95 (m, 1H); 7.85-7.8 (m, 1H); 7.65-7.6 (m, 2H); 6.62 (s, 2 H, -NH₂); 4.46 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz); 3.99 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz); 2.84 (s, 3H); 2.46 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz); 2.06 (m, 2H);
20 1.12 (t, 3H; *J* = 7.1 Hz). Análisis Elemental para C₂₃H₃₁N₃O₅S·1/2H₂O: C, 58.70; H, 6.85; N, 8.93. Encontrado: C, 58.74; H, 7.06; N, 9.26.

Procedimiento general para la condensación de benzimidazoles con 1,2-dicetonas. Se suspendieron cantidades equivalentes (10 mmol) de las sales de *N*-amino benzimidazolio, la 1,2-dicetona, y acetato de sodio anhidro (0,82 g, 10 mmol) en acetona seca (10 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 h.
25 El precipitado formado se filtró y el sólido se lavó con agua fría (10 mL), Et₂O (éter dietílico) (2 X10 mL), se secó a vacío y se recristalizó.

Ejemplo 33. Preparación de mesitilensulfonato de 9-(etoxicarbonilmetil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-*a*]benzimidazol-14-io (Compuesto 35, Esquema 4)

Rto = 93%. P. f. = 240-241 °C (metanol, sólido amarillo). ^1H RMN (DMSO- d_6) 9.64 (s, 1H); 8.55-8.5 (m, 3H); 8.4-8.35 (m, 2H); 8.28 (d, 1H, J = 8.1 Hz); 8.0-7.85 (m, 4H); 5.96 (s, 2H); 4.27 (q, 2H, J = 6.9 Hz); 1.28 (t, 3H, J = 6.8 Hz). Análisis Elemental para $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C, 68.37; H, 5.04; N, 7.25. Encontrado: C, 68.15; H, 5.26; N, 7.15.

Ejemplo 34. Preparación de mesitilensulfonato de 9-(3-etoxicarbonilpropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io (Compuesto 39, Esquema 4)

Rto = 82%. P. f. = 236-237 °C (metanol, sólido amarillo). ^1H RMN (DMSO- d_6) 9.63 (s, 1H); 8.61 (d, 1H, J = 7.2 Hz); 8.57 (d, 1H, J = 7.2 Hz); 8.54 (d, 1H, J = 8.2 Hz); 8.44 (d, 1H, J = 8.2 Hz); 8.41 (d, 1H, J = 8.2 Hz); 8.31 (d, 1H, J = 8.2 Hz); 8.44 (at, 2H, J = 7.7 Hz); 7.97 (at, 1H, J = 7.7 Hz); 7.86 (at, 1H, J = 7.8 Hz); 4.90 (t, 2H, J = 6.9 Hz); 3.97 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 2.56 (t, 2H, J = 7.5 Hz); 2.3-2.25 (m, 2H); 1.09 (t, 3H, J = 7.1 Hz). Análisis Elemental para $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5\text{S} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 68.16; H, 5.56; N, 6.81. Encontrado: C, 67.94; H, 5.67; N, 7.08.

Procedimiento general para la hidrólisis de ésteres. Una mezcla del éster (1 mmol) y ácido bromhídrico (48%) (5 mL), se calienta a reflujo durante 2 horas. Se deja enfriar la reacción, se filtra y el producto se lava con acetona (2 x 10 mL). Finalmente, se seca a vacío a temperatura ambiente.

Ejemplo 35. Preparación de bromuro de 9-carboximetil-acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (Compuesto 36, Esquema 4)

Se obtiene un sólido amarillo (0,402 g; 93%). P. f. = 298-300 °C. ^1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 9,73 (s, 1H); 8,56-8,48 (m, 3H); 8,38-8,28 (m, 3H); 8,04-7,94 (m, 3H); 7,86 (t_{ap}, 1H, J = 7,6 Hz); 5,85 (s, 2H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3378; 3016; 2907; 2766; 2548; 1752-1729; 1611; 1528; 1467; 1413; 1374; 1338; 1286; 1215; 1099; 825; 773; 751 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para

$C_{22}H_{14}N_3O_2Br \cdot 1/2H_2O$; C: 61,12; H: 3,26; N: 9,72; encontrado: C: 59,87; H: 3,42; N: 9,52.

Ejemplo 36. Preparación de bromuro de 9-(3-carboxipropil)-acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (Compuesto 40, Esquema 4)

Se obtiene un sólido amarillo (0,432 g; 94%). P. f. = 299-300 °C. 1H -RMN (300 MHz; DMSO- d_6): δ 9,74 (s, 1H); 8,62 (d, 1H, J = 7,0 Hz); 8,56 (d, 1H, J = 8,2 Hz); 8,41 (d, 1H, J = 8,2 Hz); 8,40 (d, 1H, J = 8,2 Hz); 8,32 (d, 1H, J = 8,2 Hz); 8,06-8,00 (m, 2H); 7,97 (t_{ap} , 1H, J = 7,8 Hz); 7,86 (t_{ap} , 1H, J = 7,5 Hz); 4,90 (t, 2H, J = 7,0 Hz); 2,51 (t, 2H, J = 7, 3 Hz); 2,28-2,20 (m, 2H) ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3380; 2960; 1722; 1629; 1607; 1528; 1419; 1401; 1299; 1205; 1180; 1100; 830; 762 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $C_{24}H_{18}N_3O_2Br \cdot 3/2H_2O$; C: 59,15; H: 4,34; N: 8,62; encontrado: C: 59,17; H: 4,35; N: 9,01.

15

Ejemplo 37. Acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol (Compuesto 41, Esquema 4)

Una suspensión de **36** (0,43 g; 1 mmol) en cloruro de tionilo destilado (10 mL) se calienta a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida, sin llegar a sequedad, y se adiciona acetonitrilo (10 mL). El precipitado obtenido se filtra, suspendiéndose con agitación vigorosa en una disolución de TEA (1 mL) en etanol (10 mL). El sólido se filtra y lava con etanol, recristalizándose en metanol. De esta forma, se obtiene el producto como un sólido amarillo (0,15 g; 52%).

1H -RMN (300 MHz; $CDCl_3$): δ 8,88 (s, 1H); 8,41 (d, 1H, J = 7,0 Hz); 8,35 (d, 1H, J = 6,9 Hz); 8,25-8,20 (m, 2H); 8,17 (d, 1H, J = 8,4 Hz); 7,93-7,85 (m, 3H); 7,52 (t, 2H, J = 7,7 Hz) ppm.

Ejemplo 38. Bromuro de 9-(3-bromopropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (Compuesto 42, Esquema 4)

Una suspensión de **41** (0,06 g; 0,2 mmol) en 1,3-dibromopropano (2,01 g; 10 mmol) se irradia en el microondas focalizado durante 10 minutos. El precipitado

que se obtiene, se filtra en caliente, se lava y tritura con acetona. Finalmente se recrystaliza en etanol obteniendo la sal condensada alquilada (0,07 g; 90 %).

P. f. = 231-233°C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,70 (s, 1H); 8,66-8,57 (m, 3H); 8,44 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 8,33 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 8,10-8,03 (m, 2H); 7,97 (t_{ap}, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 7,3$ Hz); 7,87 (t_{ap}, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 7,3$ Hz); 4,97 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz); 3,67 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz); 2,55-2,50 (m, 2H) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 153,2; 140,3; 139,5; 136,8; 132,5; 132,0; 131,9; 130,6; 130,5; 130,4; 130,4; 129,8; 129,2; 128,9; 127,1; 126,1; 124,2; 114,0; 113,9; 112,0; 40,6; 32,7; 32,7; 31,3 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3416; 2941; 2892; 1628; 1610; 1529; 1480; 1425; 1245; 1165; 1098; 1034; 817; 778; 750; 636 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{Br}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; C: 53,82; H: 3,73; N: 8,18; encontrado: C: 53,90; H: 3,81; N: 8,26.

Ejemplo 39. Dibromuro de 9-(4,4,8-trimetil-8-aza-4-azoniononanil) acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io (Compuesto 43, Figura 4)

Método A: Una suspensión de **42** (0,19g; 0,4 mmol) y 1,1,2,2-tetrametilpropanodiamina (0,025 g; 0,2 mmol) en DMF (20 mL), se calienta a 90-100 °C durante 72 horas. Tras concentrar a sequedad la mezcla, el residuo sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente una mezcla metanol:diclorometano (10:1), aislando 0,05 g (46%) de un sólido amarillo pálido.

Método B: Una suspensión de **42** (0,19g; 0,4 mmol) y 1,1,2,2-tetrametilpropanodiamina (0,025 g; 0,2 mmol) en DMSO (10 mL), se irradia con microondas focalizado durante 10 minutos a una potencia de 290 vatios. Tras filtrar el precipitado, éste se recrystaliza en etanol, obteniéndose un sólido (0,04 g; 35%).

P. f. > 300 °C. ^1H -RMN (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 10,28 (s, 1H); 8,78 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz); 8,58 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz); 8,47-8,41 (m, 3H); 8,06-7,96 (m, 3H); 7,88 (t_{ap}, 2H, $J = 8,0$ Hz, $J = 7,2$ Hz); 5,04 (s_{ap}, 2H); 3,68-3,78 (m, 2H); 3,47-3,34 (m, 2H); 3,09 (s, 6H); 3,05 (s_{ap}, 2H); 2,79 (s, 6H); 2,79-2,68 (m, 2H); 2,28-2,16 (m, 2H) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): δ 155,0; 144,8; 139,4; 138,1; 135,4; 131,1;

130,9; 130,7; 129,3; 129,2; 129,1; 129,0; 127,8; 127,6; 125,9; 125,1; 123,0; 114,0; 113,0; 112,7; 49,9; 46,2; 45,2; 41,3; 26,1; 21,7; 19,3; 19,1; 17,3 ppm. IR (ν_{max} , KBr): 3419; 3013; 1611; 1529; 1467; 1099; 1036; 828; 760 cm^{-1} . Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{Br}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; C: 54,47; H: 5,94; N: 10,59; encontrado: C: 54,73; H: 5,83; N: 10,70.

Ejemplo 40. Determinación de la viabilidad celular de la línea THP-1 preincubada durante 24 h con concentraciones crecientes de diversos compuestos (Fig. 1)

La línea pro-monocítica humana THP-1 se incubó durante 24 h en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) y concentraciones crecientes de los compuestos **24** (Fig. 1A), **17** (Fig. 1B), **7** (Fig. 1C), **23** (Fig. 1D), **22** (Fig. 1E) y **40** (Fig. 1F). Para determinar el efecto de la estimulación celular sobre la viabilidad, duplicados de los cultivos se estimularon con 100 ng/mL de lipopolisacárido bacteriano (LPS, SIGMA-Aldrich) durante las últimas 4 horas.

La viabilidad celular se determinó en cada caso por citometría de flujo mediante el porcentaje de exclusión de yoduro de propidio añadido a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. El análisis mediante citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur con el software CellQuest Pro (BD Bioscience, San José, CA, USA).

Los compuestos **24**, **7** y **40** no afectaron a la viabilidad celular en un rango de concentraciones de 10 μM -100 μM . Los compuestos **23**, **22** y **17** mostraron toxicidad a concentraciones superiores a 10 μM .

Ejemplo 41. Producción de $\text{TNF-}\alpha$ inducida por LPS (100 ng/ml) en la línea celular promonocítica humana THP-1 en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos (Fig. 2)

Células THP-1 se cultivaron durante 24 h en RPMI/5% FCS en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos elegidas

- dentro de los rangos que no mostraron citotoxicidad. Se estimularon con 100 ng/ml de LPS durante las últimas 4 horas de cultivo. La determinación de las concentraciones de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en el sobrenadante de los cultivos se realizó mediante Human TNF ELISA Set (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de la proteína recombinante humana. La absorbancia se midió a 450 nm en el lector de placas Synergy 4 analizando los resultados con el software Gen 5 (Biotek).
- Se muestran los valores (pg/ml de TNF- α /10⁵ células) como media \pm SD de 5 experimentos realizados con el compuesto **24** (Fig. 2A), media \pm SD de 9 experimentos realizados con el compuesto **17** (Fig. 2B), media de 2 experimentos realizados con el compuesto **7** (Fig. 2C), media de 2 experimentos realizados con el compuesto **23** (Fig. 2D), media \pm SD de 3 experimentos realizados con el compuesto **22** (Fig. 2E) y media \pm SD de 6 experimentos realizados con el compuesto **40** (Fig. 2F).

Los 6 compuestos provocaron una disminución de la producción de TNF- α inducida por LPS. Los mejores resultados en función de la dosis-respuesta se obtuvieron en presencia de los compuestos 40 y 17, siendo el compuesto 17 efectivo a una concentración 10 veces menor.

A continuación se muestra en la tabla 1 la inhibición de la producción de TNF- α de los compuestos anteriores y de algunos compuestos más:

25

Tabla 1.- Inhibición (%) de la producción de TNF- α por compuestos de Fórmulas (I), (III) y (IV).

Compuesto (ejemplo)	% Inhibición TNF- α en células THP-1							
	0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	IC ₅₀ (μ M)

4 (3)				89				
7 (6)		44	56	29	47			
8 (7)				88				
13 (11)				94				
17 (15)	-0,97	34,9	63,4	87,8				4,49
20 (17)				76				
22 (19)		51	67	45	94			11,5
23 (20)		11	36	72	79			
24 (21)				38	29	35	40	
27 (24)				94				
28 (25)				87				
31 (28)				34	90			
36 (35)	9	12	7	45	84			14,6
40 (36)				19	47	70	85	39,2
43 (39)			7	39	86			14,9

Ejemplo 42. Efecto del compuesto 17 sobre la producción de TNF- α estimulada por LPS en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Fig. 3)

- 5 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron a partir de donaciones de sangre de individuos sanos mediante centrifugación en gradiente de ficoll (Amersham Biosciences). Se cultivaron en RPMI/10% FCS durante 24 h en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **17** y se estimularon con 10 ng/mL de LPS durante las últimas 4 horas de cultivo. El
- 10 TNF- α secretado se evaluó en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA como en el caso anterior. Los resultados (pg/ml de TNF- α /10⁵ células) se expresan como media \pm SD de 5 experimentos independientes.

15 A bajas concentraciones (0,1 μ M-1 μ M) la respuesta interindividual fue muy variable. Sin embargo a 5 y 10 μ M se observó una inhibición de la producción de TNF en todos los cultivos.

Ejemplo 43. Efecto del compuesto 17 sobre la producción de TNF- α estimulada por LPS en monocitos aislados de sangre periférica de individuos sanos (Fig. 4)

Se aislaron monocitos (células CD14+) a partir de PBMCs de individuos sanos
5 utilizando microesferas magnéticas asociadas a anticuerpo anti-CD14 humano (Miltenyi Biotec). Las separaciones celulares se realizaron con el sistema automático AutoMacs o de forma manual con columnas magnéticas (Miltenyi Biotec). Se verificó mediante citometría de flujo que en todos los casos la pureza era superior al 90% en las fracciones celulares separadas.

10

Una vez aislados se cultivaron en RPMI/10% FCS durante 24 h en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **17** y se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante las últimas 4 horas de cultivo. El TNF- α secretado se evaluó en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA como en el caso anterior. Los
15 resultados (pg/ml de TNF- α /10⁵ células) se expresan como media \pm SD de 11 experimentos independientes.

En monocitos aislados se observó inhibición de la producción de TNF- α en los cultivos pretratados con el compuesto 17 a una concentración final de 1 o 10
20 μ M.

Ejemplo 44. Cálculo de la concentración inhibidora al 50% (IC₅₀) para el compuesto 17 en células THP-1 (Fig. 5)

Tomando como referencia la concentración de TNF- α secretada al medio
25 estimulada mediante el tratamiento de 4 horas con 100 ng/mL de LPS en ausencia de compuesto, se ha calculado el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones testadas del compuesto **17** en cada experimento y se ha calculado la media del porcentaje de inhibición para cada concentración en los 9 experimentos realizados. Con estos valores se ha elaborado una recta
30 de regresión para interpolar el 50% de inhibición que en este caso correspondería a una concentración de 4,49 μ M del compuesto **17** durante 20 h previas a la estimulación.

Ejemplo 45. Cálculo de la concentración inhibidora al 50% (IC₅₀) para el compuesto 17 en PBMCs (Fig. 6)

Tomando como referencia la concentración de TNF- α secretada al medio estimulada mediante el tratamiento de 4 horas con 10 ng/mL de LPS en ausencia de compuesto, se ha calculado el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones testadas del compuesto **17** como en el caso anterior. La concentración calculada en PBMCs es de 2,65 μ M de compuesto **17** durante 20 h previas a la estimulación.

10

Tabla 2. - Inhibición (%) de la producción de TNF- α por el compuesto 17

	% Inhibición TNF- α en PBMCs							
Compuesto (ejemplo)	0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
17 (15)	22,7	38,8	71,2	69,2				2,65

15

Ejemplo 46. Cálculo de la concentración inhibidora al 50% (IC₅₀) para el compuesto 17 en monocitos humanos aislados de sangre periférica (Fig. 7)

Tomando como referencia la concentración de TNF- α secretada al medio estimulada mediante el tratamiento de 4 horas con 10 ng/mL de LPS en ausencia de compuesto, se ha calculado el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones testadas del compuesto **17** como en el caso anterior. La concentración calculada en monocitos humanos (células CD14+) en cultivo es de 2,01 μ M de compuesto **17** durante 20 h previas a la estimulación.

25

Tabla 3.- Inhibición (%) de la producción de TNF- α por el compuesto 17

	% Inhibición TNF- α en monocitos humanos
--	---

Compuesto (ejemplo)	0,5 μ M	1 μ M	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	IC ₅₀ (μ M)
17 (15)	21,44	38,15	62,18	92,6	96,46			2,01

Ejemplo 47. Análisis del efecto de la administración *in vivo* del compuesto 17 (Fig. 8)

5 Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL6 (Charles River, Barcelona, España). Tras la recepción los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas para minimizar la infección por patógenos. Los ratones utilizados tenían 8-9 semanas de edad y un peso aproximado de 20 gr.

10

Se administraron intra-peritonealmente 2 dosis del compuesto **17** (2mg/kg en 200 μ L de suero salino) con un intervalo de 18h. Cuatro horas después de la segunda dosis se sacrificaron los animales, se extirparon los bazo y se disgregaron mecánicamente para obtener suspensiones celulares. Las células del bazo se cultivaron "in vitro" en RPMI/10% FBS en presencia o ausencia de LPS (10ng/mL) durante 4h. Los niveles de TNF- α secretado se midieron en el sobrenadante de cultivo mediante citometría de flujo (CBA). Control vs LPS p= 0,0156 (*p<0,05) test de Wilcoxon. LPS vs T78d+LPS p= 0,0205 (*p<0,05) test de Mann-Whitney.

20

Como se aprecia en la Fig. 8 las células de ratones que han sido tratados *in vivo* con el compuesto 17 muestran una producción significativamente menor de TNF- α cuando son estimuladas con LPS. Este resultado indica que el compuesto es efectivo cuando es administrado *in vivo*.

25

Ejemplo 48. Inhibición de la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8 e IL-6 en la línea celular THP-1 por el compuesto 17 (Fig. 9).

Se cultivaron células THP-1 durante 24 h en RPMI/5% FCS en presencia o ausencia de concentraciones crecientes del compuesto 17 dentro de los rangos

que no mostraron toxicidad. Las células se estimularon con 100 ng/ml de LPS durante las últimas 4 horas. La concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8 e IL-6 se determinó en los sobrenadantes de cultivo mediante citometría de flujo y CBA (Cytokine Bead Arrays) (BD Biosciences) con software FCAParray (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 49. Inhibición de la producción de las adipocitoquinas IL-6 y leptina en adipocitos humanos maduros generados *in vitro* a partir de precursores mesenquimales de tejido adiposo por el compuesto 17 (Fig. 10).

Células madre mesenquimales fueron aisladas a partir de restos quirúrgicos de tejido adiposo humano y diferenciadas según protocolos descritos (Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. *Tissue Eng.* **2001** Apr;7(2):211-28). Tras la diferenciación los adipocitos fueron tratados con concentraciones crecientes del compuesto **17** durante 24 h y posteriormente estimulados durante 24h (Fig. 10A) o 48 horas (Fig. 10B) con 50 ng/ml de LPS. La concentración de IL-6 se determinó en los sobrenadantes de cultivo mediante citometría de flujo y CBA como se ha descrito anteriormente. La concentración de leptina se evaluó mediante ELISA convencional (Human Leptin ELISA DuoSet, R&D).

El pretratamiento con el compuesto **17** inhibió la producción de IL-6 (Fig. 10A) y la producción de leptina (Fig. 10B) en adipocitos humanos de forma dependiente de dosis.

Ejemplo 50. Inhibición de la transcripción de TNF- α por el compuesto 17 en PBMCs y en monocitos humanos (Fig. 11).

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Fig. 11A) y monocitos primarios humanos (Fig. 11B) se aislaron a partir de donaciones de sangre de individuos sanos como en los ejemplos anteriores, se cultivaron durante 18 horas en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **17** y

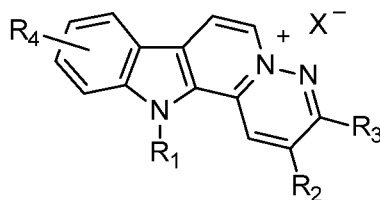
posteriormente se estimularon con LPS durante 2 h. Se aisló ARN de los cultivos y el mensajero de TNF- α se cuantificó mediante transcripción inversa y PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como unidades relativas tras normalización frente al mRNA de β 2 microglobulina cuantificado en las mismas muestras.

Ejemplo 51. Inhibición de la actividad NF κ B por el compuesto 17 (Fig. 12).

Con objeto de analizar si el compuesto **17** afecta a la actividad del factor de transcripción NF κ B, la línea celular cos 7 se transfectó con el vector NF κ B-luc en el que la expresión del gen luciferasa se encuentra bajo el control de un promotor mínimo precedido por tres sitios NF κ B. La actividad del promotor y subsecuente expresión del gen reportero se indujo mediante el tratamiento con LPS (100 ng/ml) y TNF- α (10ng/ml) durante 2 horas. El pretratamiento durante 18 h con el compuesto **17** (1 μ M) bloqueó la inducción de la expresión del gen reportero evaluada mediante la cuantificación por RT-PCR cuantitativa del RNA mensajero de luciferasa. En paralelo se cuantificó el mensajero del gen ribosomal ARF5 como control endógeno. Los resultados se expresan como unidades relativas tras normalización de las moléculas de mRNA de luciferasa en relación con el número de moléculas de mRNA de ARF5 detectadas en las mismas muestras.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I):



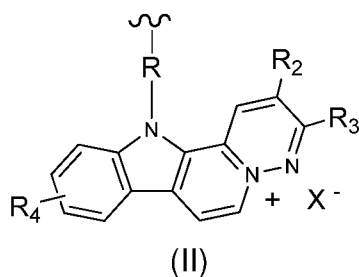
5

(I)

donde:

R₁ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), alquenilo (C₂-C₁₀), alquinilo (C₂-C₁₀), -(CH₂)_nCO₂R₁', -(CH₂)_mR₁'', - (CH₂)_pCONHR₁'''' o el grupo de fórmula (II):

10



(II)

15 donde R se selecciona de la lista que comprende alquilo (C₁-C₂₀), alquenilo (C₂-C₂₀), alquinilo (C₂-C₂₀), -(CH₂)_nCO₂R₁'-O₂C(CH₂)_n- ó -(CH₂)_pCONHR₁''''-NHOC(CH₂)_p-; n, m o p tienen un valor de entre 0 y 5 y R₁' se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C₁-C₁₀), R₁'' se selecciona de entre halógeno, alquenilo (C₂-C₄) o alquinilo (C₂-C₄) y R₁''' se selecciona de entre alquilo (C₁-C₄), alquenilo (C₂-C₄) o alquinilo (C₂-C₄);

20

R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₆), arilo, heteroarilo o R₂ y R₃ pueden estar enlazados entre si formando parte de un anillo, saturado o aromático;

R₄ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), halógeno, nitro, amino, hidroxilo, O-R₄', donde R₄' se selecciona de entre un alquilo (C₁-C₁₂), arilo, aralquilo o heteroarilo; y

25

X^- es un anión biológica o farmacéuticamente aceptable;
o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la
elaboración de un medicamento para la inhibición de la producción de TNF-
 α .

5

2. Uso según la reivindicación 1, donde R_1 se selecciona de entre hidrógeno,
- $(CH_2)_nCO_2R_1'$ o - $(CH_2)_mR_1''$.

10

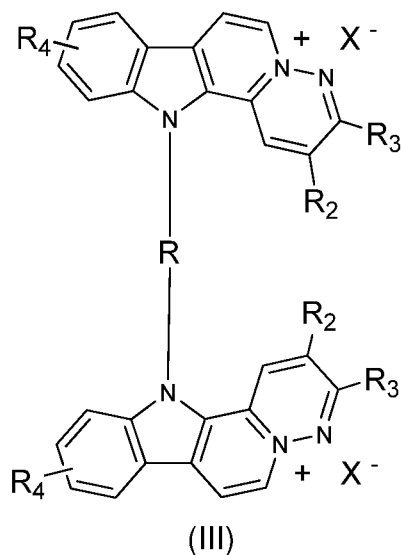
3. Uso según la reivindicación anterior, donde R_1' se selecciona de entre
hidrógeno o alquilo (C_1-C_{10}) y n es 0 ó 1.

4. Uso según la reivindicación 2, donde R_1'' se selecciona de entre halógeno o
un alquilo (C_2-C_3) y m tiene un valor de 2 a 4.

15

5. Uso según la reivindicación anterior, donde R_1'' es yodo o etinilo y m es 3.

6. Uso según la reivindicación 1, donde R_1 es el grupo de fórmula (II) y dicho
compuesto es el de fórmula general (III):



20

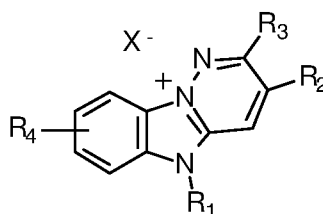
donde R, R_2 , R_3 , R_4 y X^- se han descrito en la reivindicación 1.

7. Uso según la reivindicación anterior, donde R es alquilo (C₅-C₁₅), alquenilo (C₅-C₁₅) o alquinilo (C₅-C₁₅).
8. Uso según la reivindicación anterior, donde R es deca-4,6-diin-1,10-diilo.
- 5 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre metilo, etilo, 2-furilo o 1,8-naftodiilo.
- 10 10. Uso según la reivindicación anterior, donde R₂ y R₃ son iguales.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R₄ se selecciona de entre amino, bromo, nitro, metoxilo o benzoxilo.
- 15 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde X⁻ es haluro o mesitilensulfonato.
13. Uso según la reivindicación anterior, donde el haluro es bromuro.
- 20 14. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de entre:
mesitilensulfonato de 9-bromo-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-11-nitropiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
25 dicloruro de 11-amonio-2,3-dietil-12*H*-piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
mesitilensulfonato de 10-benciloxi-12-*terc*-butoxicarbonil-2,3-dietilpiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
bromuro de 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-
30 inio,
mesitilensulfonato de 2,3-dietil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,

bromuro de 2,3-dietil-12-etoxicarbonilmetil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
 yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
 5 bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
 mesitilensulfonato de 14-metoxi-16-(pent-4-inil)acenafto[1'',2'':3',4']piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-9-inio,
 mesitilensulfonato de 2,3-di-(2-furil)-10-metoxi-12-(pent-4-
 10 inil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio y
 dimesitilensulfonato de 12,12'-(deca-4,6-diin-1,10-diil)-bis-(2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio).

15. Uso según la reivindicación anterior, donde el compuesto es bromuro de
 15 2,3-dimetil-12*H*-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio.

16. Uso de un compuesto de fórmula general (IV):



(IV)

20 donde:

R₁ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), alquenilo (C₂-C₁₀), alquinilo (C₂-C₁₀), -(CH₂)_nCO₂R₁', -(CH₂)_mR₁'', -(CH₂)_pCONHR₁'''' y donde n, m o p tienen un valor de entre 0 y 10 y R₁' se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C₁-C₁₀), R₁'' se selecciona de entre
 25 halógeno y el grupo -⁺NR_aR_b-(CH₂)_q-R_c, donde R_a y R_b son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo (C₁-C₄), R_c se selecciona de entre hidrógeno, alquilo (C₁-C₄) y el grupo -NR_a'R_b', donde R_a' y R_b' son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo

- (C₁-C₄), q tiene un valor de entre 0 y 10, y R₁''' se selecciona entre alquilo (C₁-C₄), alquenilo (C₂-C₄) o alquinilo (C₂-C₄);
- R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₆), arilo y heteroarilo; donde R₂ y R₃ pueden estar
5 enlazados entre si formando parte de un anillo, saturado o aromático;
- R₄ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), halógeno, nitro, amino, hidroxilo, O-R₄', donde R₄' se selecciona de entre un alquilo (C₁-C₁₂), arilo, aralquilo o heteroarilo; y
- X⁻ es un anión biológica o farmacéuticamente aceptable,
10 o cualquiera de sus sales para la elaboración de un medicamento para la inhibición de la producción de TNF-α.
17. Uso según la reivindicación 16, donde R₁ es -(CH₂)_nCO₂R₁' o -(CH₂)_mR₁'.
- 15 18. Uso según la reivindicación anterior, donde R₁' es hidrógeno o alquilo (C₁-C₄) y n es un número entre 1 y 5.
19. Uso según la reivindicación anterior, donde R₁' es hidrógeno o etilo.
- 20 20. Uso según la reivindicación 17, donde R₁'' es halógeno o el grupo -⁺NR_aR_b-(CH₂)_q-R_c, donde R_a y R_b son iguales y se seleccionan de entre hidrógeno o metilo, R_c es el grupo -NR'_aR'_b, donde R'_a y R'_b son iguales y se seleccionan entre hidrógeno, o metilo, y q tiene un valor de entre 1 y 3.
- 25 21. Uso según la reivindicación 20, donde R₁'' es bromo o 4-amonio-7-aza-3,4,8-trimetiloctilo.
22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, donde R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y se seleccionan de entre alquilo (C₁-C₄), heteroarilo o
30 están enlazados entre si formando parte de un anillo.

23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, donde R_2 y R_3 son 1,8-naftodiilo.
24. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, donde R_4 es hidrógeno.
25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, donde X^- es haluro o mesitilensulfonato.
26. Uso según la reivindicación anterior, donde el haluro es bromuro.
27. Uso según la reivindicación 16, donde el compuesto se selecciona de entre:
bromuro de 9-carboximetilacenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io,
bromuro de 9-(3-carboxipropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io y
dibromuro de 9-(4,4,8-trimetil-8-aza-4-azoniononanil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io.
28. Uso de un compuesto de fórmula general (I), (III) o (IV) según se describen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias.
29. Uso según la reivindicación anterior, donde las enfermedades inflamatorias se seleccionan de la lista que comprende artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática autoinmune, osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, uveitis, asma, bronquitis, enfermedad obstructiva de las vías respiratorias crónica, psoriasis, rinitis alérgica, espondilitis anquilosante, hidradenitis supurativa, dermatitis y procesos inflamatorios asociados a una enfermedad renal.

30. Compuesto seleccionado de la lista que comprende:

- 5 yoduro de 2,3-dietil-10-metoxi-12-(3-yodopropil)piridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
bromuro de 12-carboximetil-2,3-dietil-10-metoxipiridazino[1',6':1,2]pirido[3,4-b]indol-5-inio,
bromuro de 9-carboximetilacenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io,
bromuro de 9-(3-carboxipropil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]benzimidazol-14-io y
10 dibromuro de 9-(4,4,8-trimetil-8-aza-4-azoniononanil)acenafto[1',2':3,4]piridazino[1,6-a]bencimidazol-14-io .

31. Composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la reivindicación 30 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

32. Uso del compuesto según la reivindicación 30, para la elaboración de un medicamento.

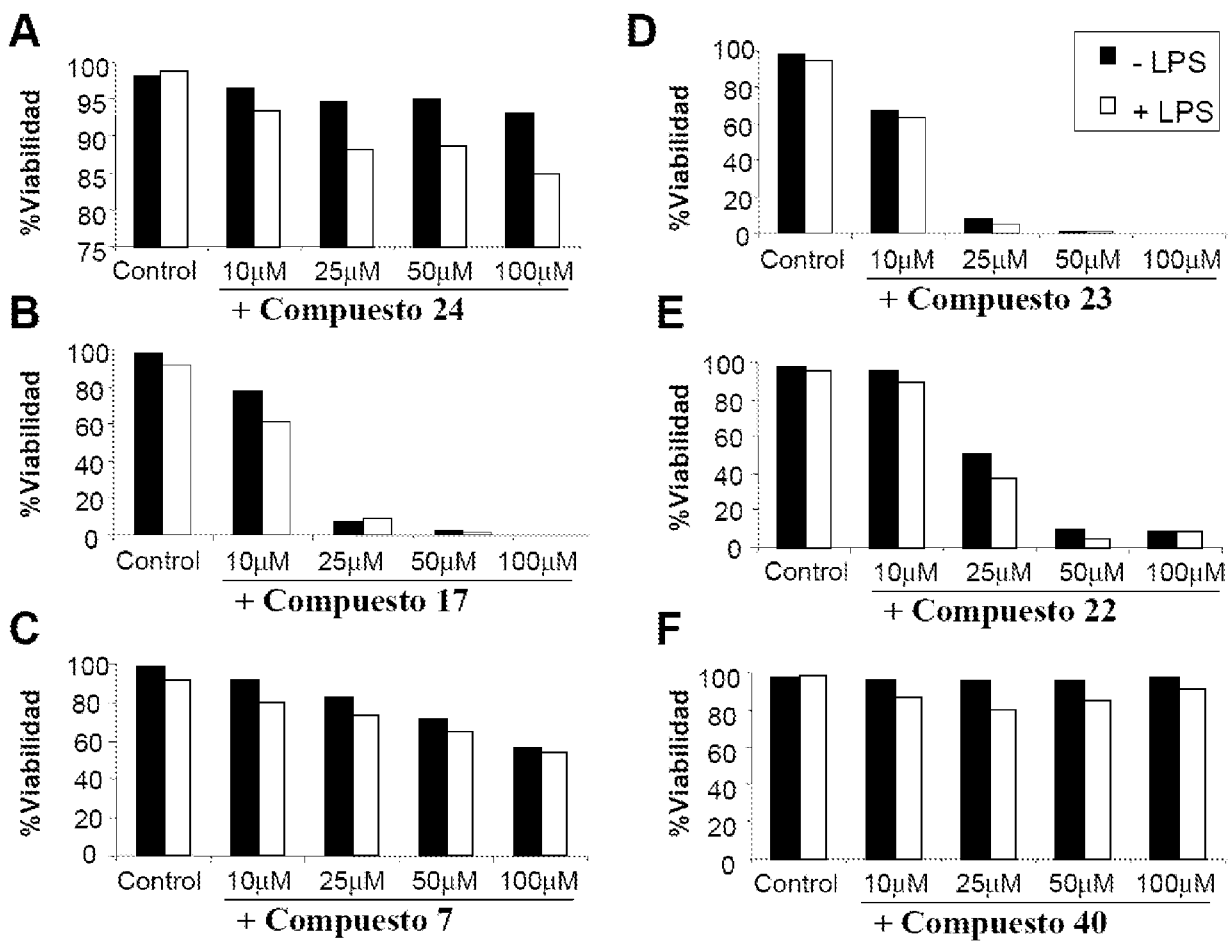


Fig. 1

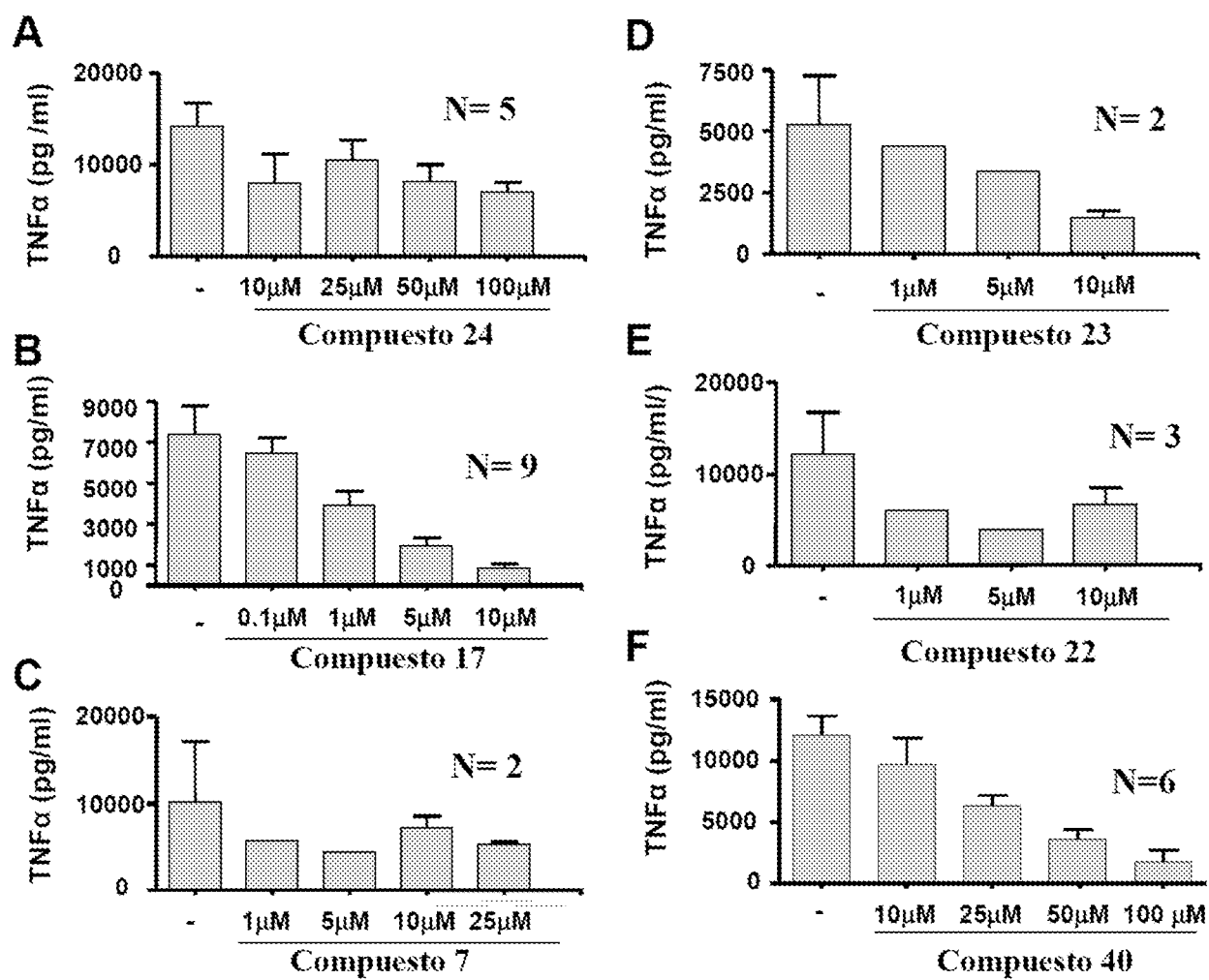


Fig. 2

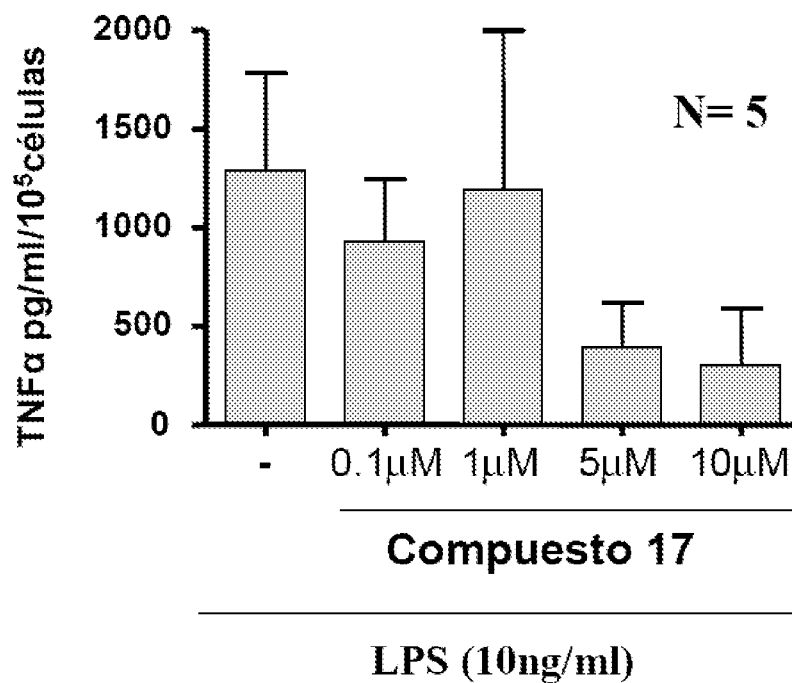


Fig. 3

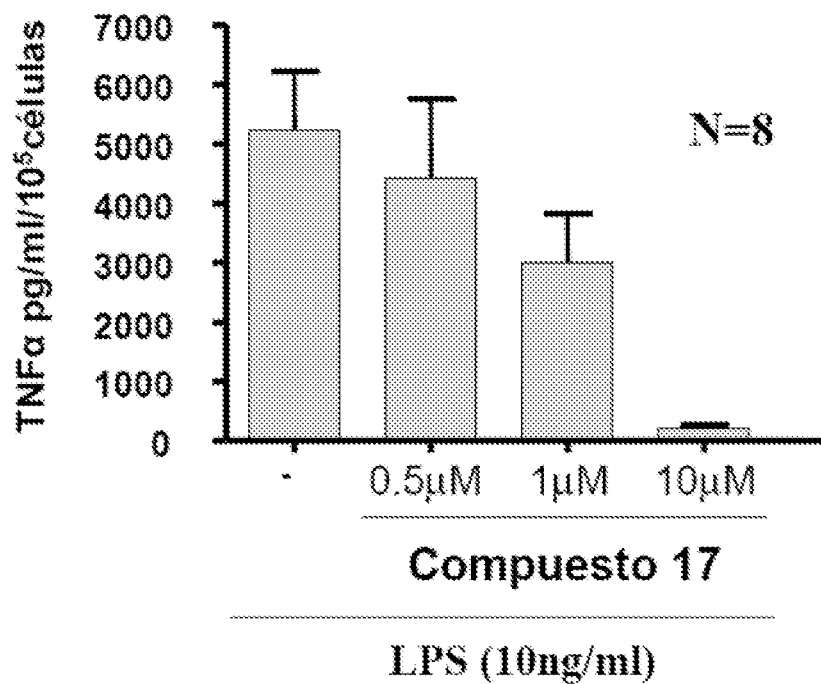


Fig. 4

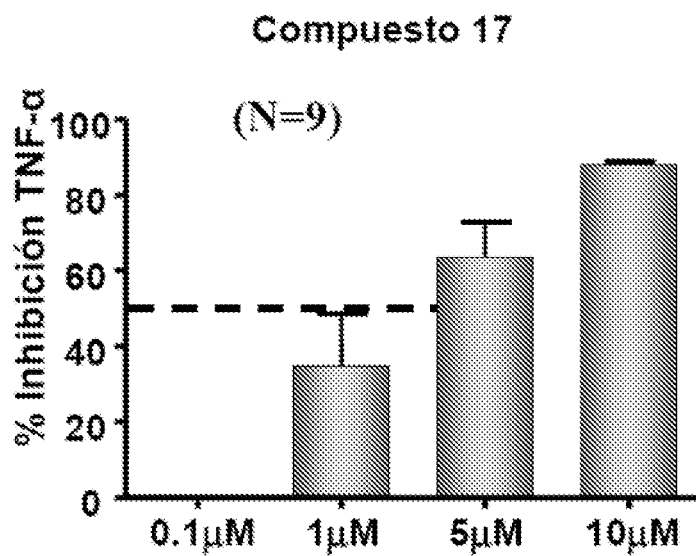


Fig. 5

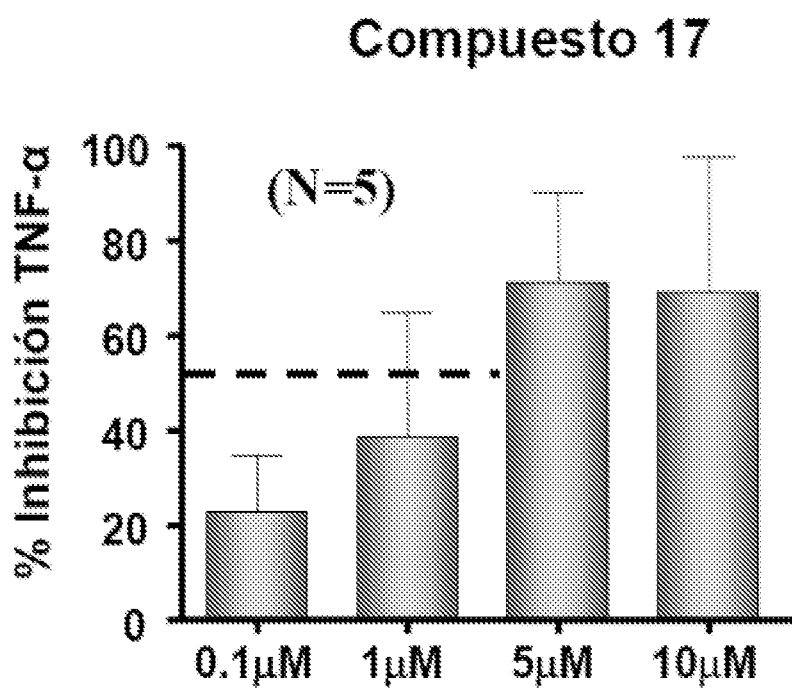


Fig. 6

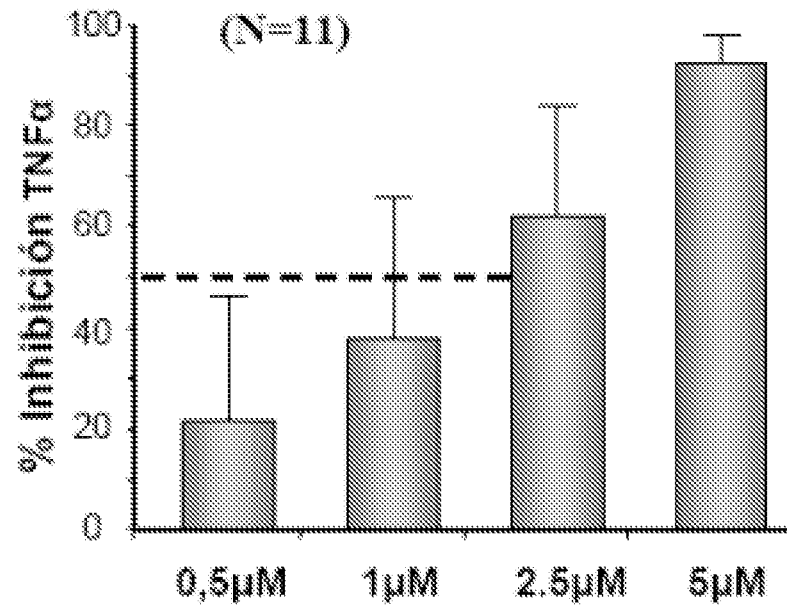
Compuesto 17

Fig. 7

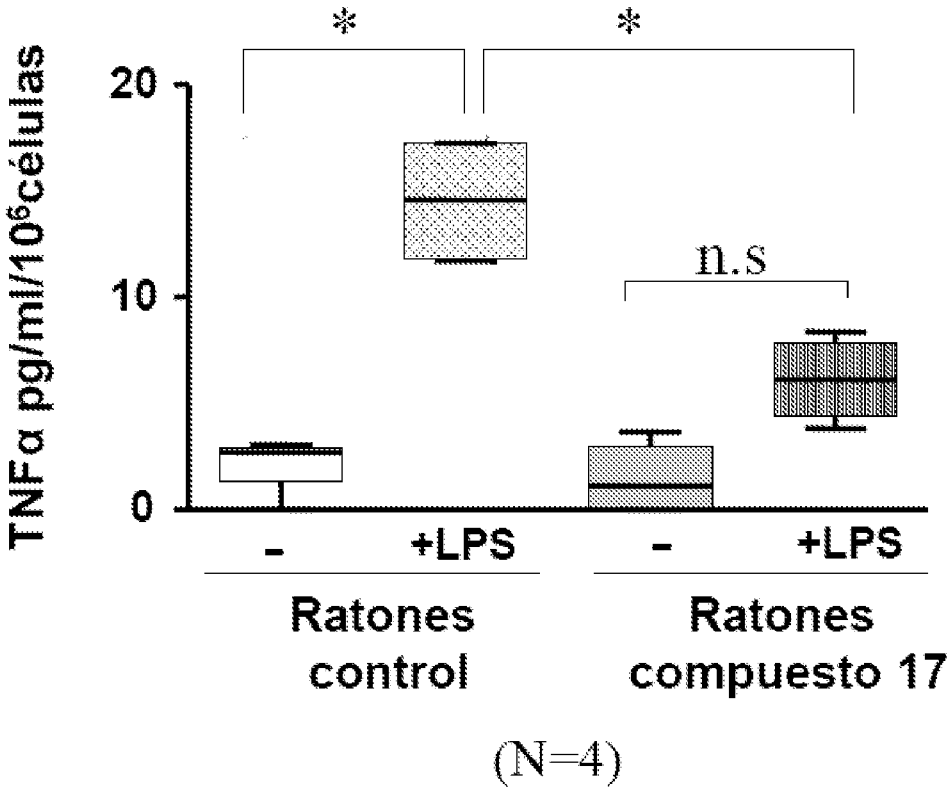


Fig. 8

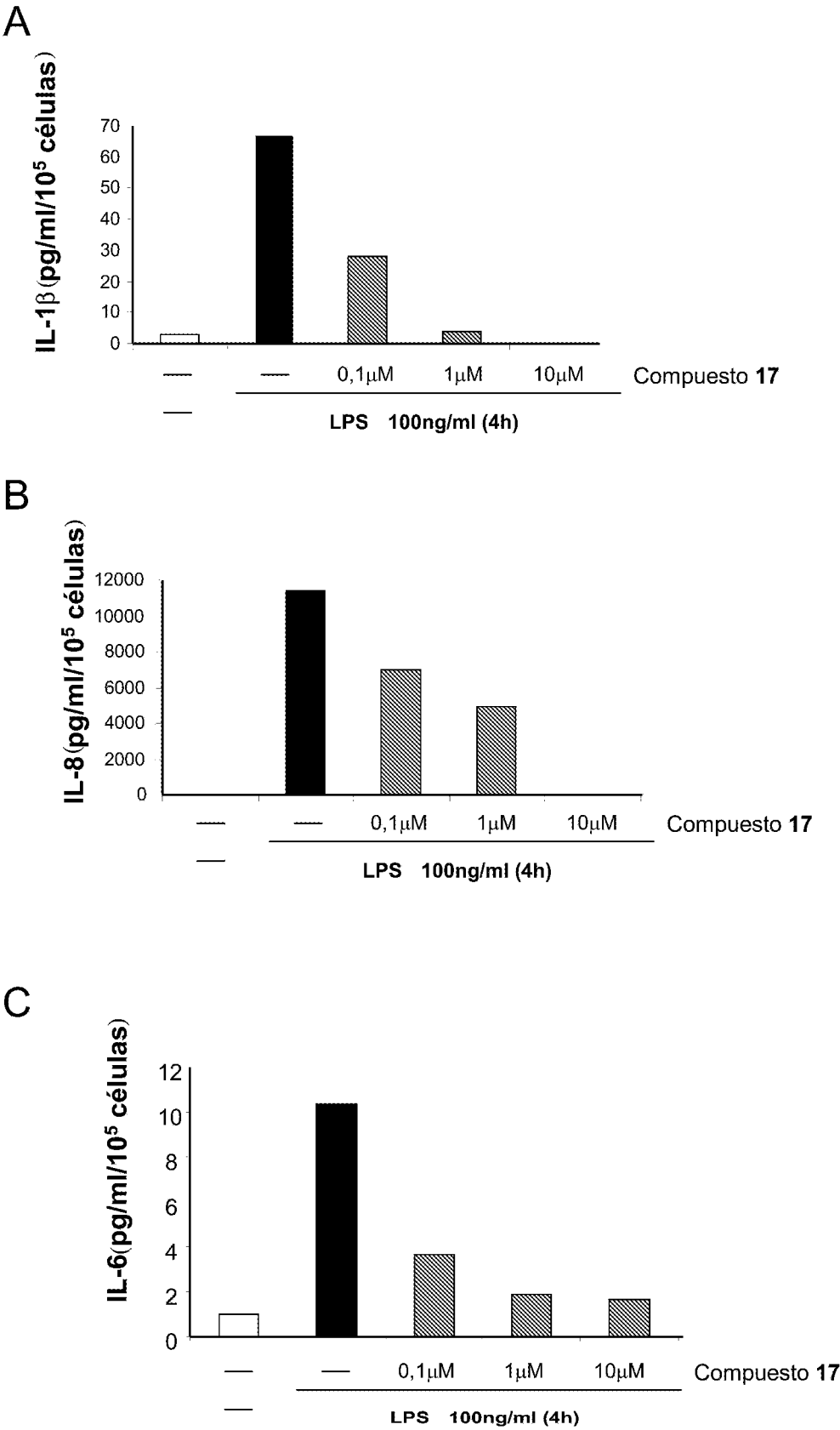


Fig. 9

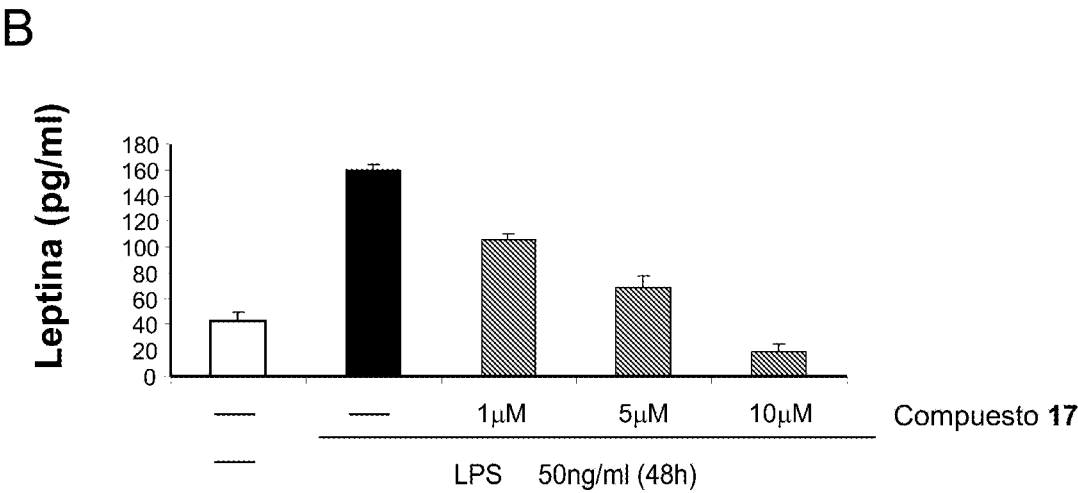
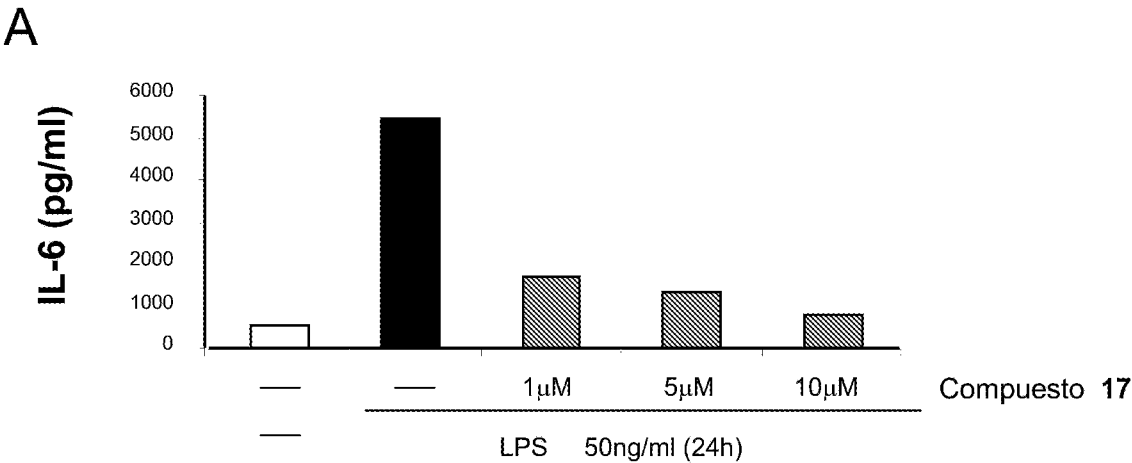


Fig. 10

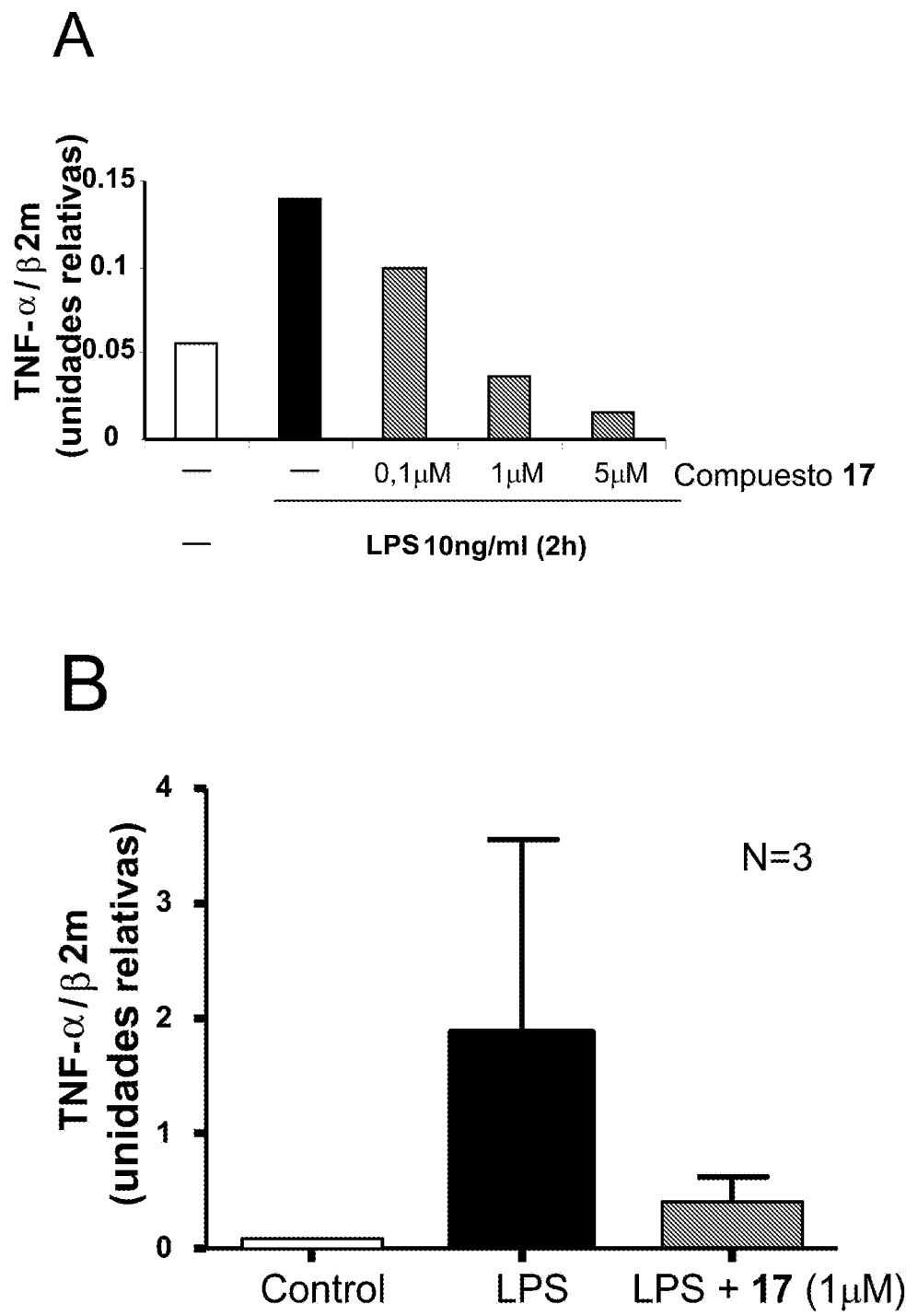


Fig. 11

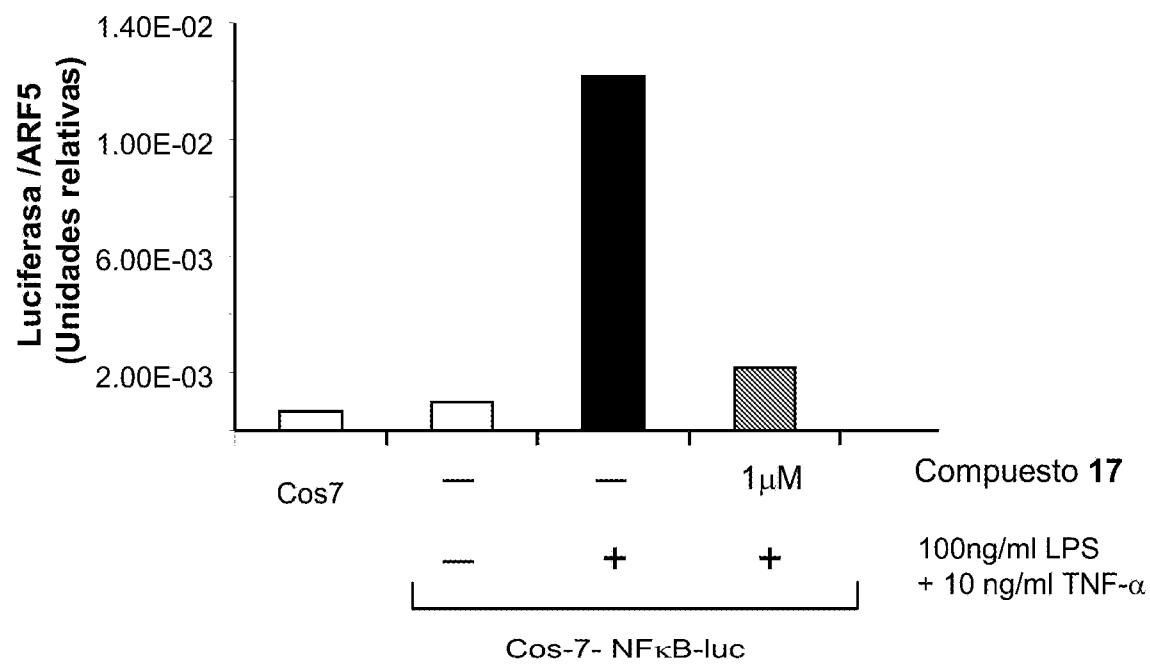


Fig. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070603

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/5025 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FONTANA ALBERTO et al. Synthesis and cytotoxic activity of pyridazino(1'6':1,2) pyrido(3,4-b)indol-5-inium derivatives as anti-cancer agents. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 16 September, 2002 16/09/2002 VOL: 12 No: 18 Pags: 2611-2614 ISSN 0960-894X, table1	1-15, 28-32
A	MATIA M P et al. New uses of Westphal condensation: Synthesis of flavocorylene and related indolo[2,3-a]quinolizinium salts. Tetrahedron Letters 1991 gb 00/00/1991 VOL: 32 No: 51 Pags: 7575 - 7578 ISSN 0040-4039 (print) Doi: doi:10.1016/0040-4039(91)80538-H, page 7576, compuestos 10 and 11.	1-15, 28-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27/10/2014

Date of mailing of the international search report
(28.10.2014)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
H. Aylagas Cancio

Telephone No. 91 3498563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070603

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DIAZ A et al. Regioselectivity in the Westphal condensation. The Journal of Organic Chemistry, 1994 0101 American Chemical Society, US 01/01/1994 VOL: 59 No: 26 Pags: 8294 - 8296 ISSN 0022- 3263 Doi: doi:10.1021/jo00105a062, table 1.</p>	1-15, 28-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070603

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-15, 28-32 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The subject matter of the invention is the use of compounds derived from pyridazino(1'6':1,2)pyrido (3,4-b)indolinium and pyridazino(3,2-b)benzylimidazolium salts or pharmaceutically acceptable salts thereof for inhibiting TNF α production, as anti-inflammatory agents, as well as the compositions containing these compounds.

The patent application contains the following groups of inventions:

Invention 1: Claims: 1-15 and claims 28-32 (in part). Use of compounds of formulae I and III derived from pyridazino pyrido indolinium for the treatment of inflammatory diseases, two compounds corresponding to these formulae and pharmaceutical compositions containing the same (claims 30-32, in part)

Invention 2: Claims: 16-27 and claims 28-32 (in part). Use of compounds of formula IV derived from pyridazino benzylimidazolium for the treatment of inflammatory diseases, three compounds corresponding to this formula and pharmaceutical compositions containing the same (claims 30-32, in part)

The problem addressed by the present application is that of providing a novel therapy for the treatment and/or prevention of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, osteoarthritis, ulcerative colitis, etc.

The first solution to this problem is the use of the compounds defined by formulae I and III in the application, which are pyridazino pyrido indolinium derivatives.

The second solution is the use of the compounds defined by the formula IV and derived from pyridazino benzylimidazolium.

Said compounds do not share a common structure, that is to say, they do not belong to the same family of compounds, and therefore each represents a different solution to the technical problem addressed. Consequently, the requirement in respect of unity of invention is not met, since there is no technical relationship among the above-mentioned groups of claims involving a single general inventive concept (PCT Rule 13.1).

Moreover, there is no other identical or corresponding special technical feature that could substantiate a technical relationship among the above-mentioned inventions within the meaning of PCT Rule 13.2.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070603

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/5025 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	FONTANA ALBERTO et al. Synthesis and cytotoxic activity of pyridazino(1'6':1,2)pyrido(3,4-b)indol-5-inium derivatives as anti-cancer agents. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 16 September, 2002 16/09/2002 VOL: 12 No: 18 Pags: 2611-2614 ISSN 0960-894X, tabla1	1-15, 28-32
A	MATIA M P et al. New uses of Westphal condensation: Synthesis of flavocorylene and related indolo[2,3-a]quinolizinium salts. Tetrahedron Letters 1991 gb 00/00/1991 VOL: 32 No: 51 Pags: 7575 - 7578 ISSN 0040-4039 (print) Doi: doi:10.1016/0040-4039(91)80538-H, página 7576, compuestos 10 y 11.	1-15, 28-32

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
27/10/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
28 Octubre 2014 (28.10.2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
H. Aylagas Cancio
Nº de teléfono 91 3498563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070603

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	DIAZ A et al. Regioselectivity in the Westphal condensation. The Journal of Organic Chemistry, 19940101 American Chemical Society, US 01/01/1994 VOL: 59 No: 26 Pags: 8294 - 8296 ISSN 0022-3263 Doi: doi:10.1021/jo00105a062, tabla 1.	1-15, 28-32

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070603

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver hoja adicional

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s: 1-15, 28-32 (en parte)

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

El objeto de la invención es el uso de compuestos derivados de sales de piridazino (1'6':1,2) pirido (3,4-b) indolinio y piridazino (3,2-b) benzimidazolio o de sus sales farmacéuticamente aceptables para la inhibición de la producción TNF- α y que se utilizan como agentes antiinflamatorios, así como las composiciones que los contienen.

La solicitud de patente presenta los siguientes grupos de invenciones:

Invención 1: Reivindicaciones 1-15 y reivindicaciones 28-32 (en parte). Uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de compuestos de fórmulas I y III derivados de la estructura piridazinopiridoindolinio, dos compuestos que responden a estas fórmulas y las composiciones farmacéuticas que los contienen (reiv. 30-32 en parte)

Invención 2: Reivindicaciones 16-27 y reivindicaciones 28-32 (en parte). Uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de compuestos de fórmula IV derivados de piridazinobenzimidazolio, tres compuestos que responden a esta fórmula y la composiciones farmacéuticas que los contienen (reiv. 30-32 en parte).

El problema que subyace en la presente solicitud es la provisión de una nueva terapia para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoidea, artritis psoriásica, osteoartritis, colitis ulcerosa, etc.

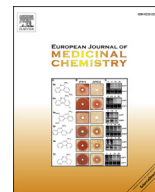
La primera solución a dicho problema es la utilización de los compuestos definidos en las fórmula I y III de la solicitud que son derivados de piridazinopiridoindolinio

La segunda solución es la utilización de los compuestos recogidos en la fórmula IV derivados de piridazinobenzimidazolio

Los compuestos mencionados no presentan una estructura común, esto es, no pertenecen a una única familia de compuestos, por lo que cada uno de ellos representa una solución distinta al problema técnico planteado.

Por lo tanto, el requisito de unidad de invención no se cumple, ya que no existe una relación técnica entre los grupos de reivindicaciones antes mencionadas de forma que se integren en un único concepto inventivo general (Regla 13.1 PCT).

Así mismo, no existe otro elemento técnico particular idéntico o correspondiente que pueda servir de base para establecer una relación técnica entre las invenciones arriba mencionadas en el sentido de la Regla 13.2 PCT.



Original article

Synthesis and biological evaluation of pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-*b*]indolinium and pyridazino[1,6-*a*]benzimidazolium salts as anti-inflammatory agents



Aranzazu Rodríguez-Sanz^a, Patricia Sánchez-Alonso^b, Teresa Bellón^{a, **},
Ramón Alajarin^{b, *}, Virginia Martínez-Cabeza^a, Rafael Selgas^c, Juan J. Vaquero^b,
Julio Álvarez-Builla^b

^a Instituto de Salud Hospital Universitario La Paz – IdiPAZ, Madrid, Spain

^b Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain

^c Hospital Universitario La Paz, Servicio de Nefrología, IdiPAZ, IRSIN, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2014

Received in revised form

27 January 2015

Accepted 30 January 2015

Available online 31 January 2015

Keywords:

Anti-inflammatory

TNF- α

Cytokine

Pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-*b*]indolinium

Pyridazino[1,6-*a*]benzimidazolium

ABSTRACT

Condensed polycyclic heteroaromatic cations bearing a bridgehead nitrogen with pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-*b*]indolinium and pyridazino[1,6-*a*]benzimidazolium structures were assayed as inhibitors of LPS-induced TNF- α production by THP-1 cells. The hit compound **1e**, which had the best IC₅₀ value (4.49 μ M) and low toxicity, was further assayed on human PMBCs (IC₅₀ 3.91 μ M) and monocytes (IC₅₀ 1.82 μ M). This compound also inhibited TNF- α production following poly I:C stimulation of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells; in the latter case, inhibition of IL-12 production was also observed. Compound **1e** was also able to inhibit TNF- α expression at the transcriptional level and proved to be effective *in vivo*. Compound **1e** is an interesting potential therapeutic agent in IMIDs.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammation is a complex and dynamic physiological process that occurs in response to cell or tissue damage and is an attempt to defend the body against external aggression. However, chronic inflammation may be pathological. Immune-mediated inflammatory disorders (IMIDs) are lifelong conditions that cause substantial

morbidity and disability [1]. Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) is a potent multifunctional cytokine that plays a pivotal role in the inflammatory response and it is mainly secreted by macrophages upon stimulation by danger signals or bacterial products such as lipopolysaccharides (LPS) [2]. TNF- α is involved in the regulation of a broad spectrum of biological processes such as cell proliferation, differentiation, apoptosis, and lipid metabolism [3]. TNF- α stimulates angiogenesis and, in combination with other proinflammatory cytokines, can provoke alterations in endothelial cells leading to several pathologies involving the microvasculature. Given its involvement as a master regulator of other inflammatory cytokines, TNF- α has been postulated to be the most important cytokine in the pathogenesis of IMIDs [4], including autoimmune diseases, insulin resistance, and cancer [5].

There is evidence to suggest that chronic inflammation has a pathological role in obesity and type 2 diabetes (T2D). Interactions between the inflammatory response and metabolism take place preferentially in adipose tissue, which is composed of adipocytes and immune cells such as macrophages [6]. TNF- α protein is also highly expressed in the adipose tissue of obese animals or humans

Abbreviations: AP, activation protein; BBDECI, 1,5-bis-[*N*-benzyl-*N*,*N*-diethylammonium]-3-oxapentane dichloride; CBA, cytometric bead array; DC, dendritic cell; IMIDs, immune mediated inflammatory diseases; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LPS, lipopolysaccharide; MSH, *O*-(mesitylsulfonyl)hydroxylamine; μ W, microwaves; NF- κ B, nuclear factor κ B; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; SD, supplementary data; TACE, TNF- α converting enzyme; TNF, tumour necrosis factor; TNFR, tumour necrosis factor receptor; T2D, type 2 diabetes.

* Corresponding author. Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

** Corresponding author. Institute for Health Research, Hospital Universitario La Paz – IdiPAZ, Paseo Castellana 261, Madrid, Spain.

E-mail addresses: teresa.bellon@salud.madrid.org (T. Bellón), ramon.alajarin@uah.es (R. Alajarin).

with T2D and it contributes significantly to insulin resistance, because the administration of recombinant TNF- α results in a resistance to insulin action [7]. Furthermore, a blockade of the biochemical, genetic, or pharmacological actions of TNF- α results in greatly increased insulin sensitivity [8]. Therefore, inhibition of the over-expression of TNF- α might be an effective strategy for the prevention and treatment of metabolic and immune-mediated diseases.

Inhibition of TNF- α activity by humanised monoclonal antibodies or soluble receptors has been effective in treating IMIDs, thus supporting the pivotal role of TNF- α in the pathogenesis of these diseases [4,9]. Despite the success achieved with biological drugs, their requirement of delivery by injection and the associated high costs have limited their use. Moreover, these biotechnological drugs are immunogenic, and some patients who receive long-term treatment will develop anti-drug antibodies, which in turn will lead to a loss of response [10]. Although synthetic antibodies such as

etanercept, infliximab, and adalimumab have been approved for the treatment of inflammatory diseases by direct inhibition of TNF- α , small-molecule inhibition to block either the function or the production of TNF- α may prove to be an alternative solution. This challenging field is still in its infancy and efforts have typically been limited to inhibitors of the processing TNF- α converting enzyme (TACE), i.e., uncharacterised inhibitors of TNF- α expression or cell-based assays, and intracellular pathway inhibitors that antagonise nuclear factor κ B (NF- κ B), activation protein 1 (AP 1), or c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 signal transduction [11]. To date, very few molecule-based inhibitors have been reported for the inhibition of *in vitro* TNF receptor 1 (TNFR1) binding to TNF- α , which is an interesting new approach that involves protein–protein binding inhibition [12,13]. Some inhibitors bearing quinazolinone [14,15], quinuclidine, or quinolizine [16] frameworks proved to bind TNF- α *in silico*. The strongest small-molecule TNF- α inhibitor reported to date, SPD304, promotes subunit disassembly of this trimeric

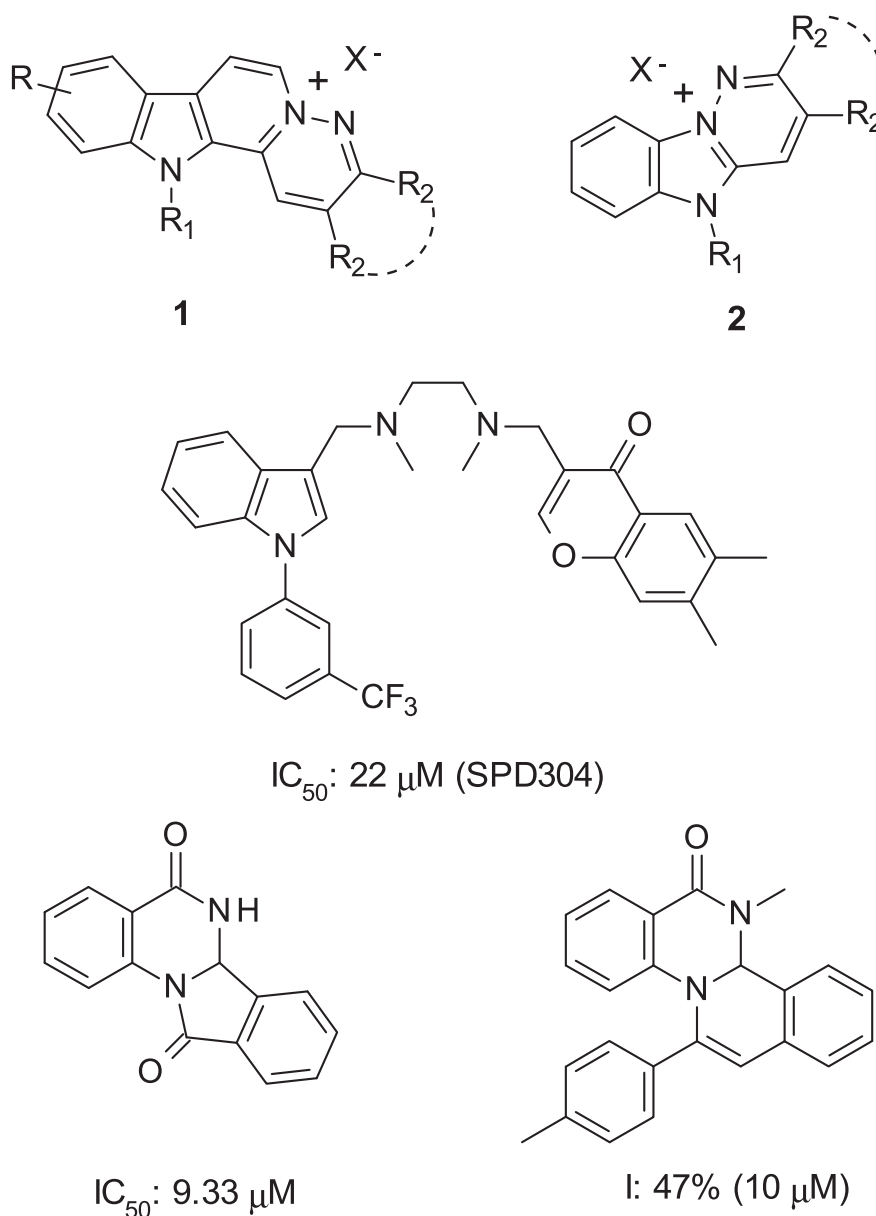


Fig. 1. General chemical structures of **1** and **2** and some TNF- α inhibitors. Indole-coumarin (SPD304), an inhibitor of TNFR1 binding to TNF- α , isoindolo[2,1-a]quinazolinone (bottom left) and isoquinolino[2,1-a]quinazolinone (bottom right), inhibitors of TNF- α production.

cytokine [17] (Fig. 1).

Herein we report on a study on the anti-inflammatory potency of a series of new and known pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-*b*]indolinium salts **1** and pyridazino[1,6-*a*]benzimidazolium salts **2** (Fig. 1). The anti-inflammatory effect was measured by the inhibition of LPS-induced TNF- α production. Furthermore, the *in vivo* anti-inflammatory effect of a selected inhibitor was also analysed.

2. Chemistry

The designed structures were divided into two classes: pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-*b*]indolinium salts **1** and pyridazino[1,6-*a*]benzimidazolium salts **2**. We previously described the synthesis of these types of compounds. Some of the examples proved to be DNA-intercalators and cytotoxic agents against leukaemia L1210 and colon carcinoma HT-29 cell lines [18,19]. We previously described compounds **1a–d** and **1f,g**, and they were re-synthesised in this study (Scheme 1) [18]. Experimental procedures and spectroscopic and analysis data for these compounds and their intermediates are provided in the [supplementary data \(SD\) appendix](#). The starting materials were the commercially available β -carboline-type natural products harmane (**3**), harmol (**4**), and harmine (**5**). The reaction sequence was a combination of *N*-alkylation or *N*-acylation at the azole nitrogen, *N*-amination at the azine nitrogen and Westphal condensation with a 1,2-diketone. The carbocyclic ring of harmane (**3**) was functionalised by electrophilic aromatic substitution and the hydroxyl group of harmol (**4**) was alkylated by Williamson reaction.

A similar synthetic strategy was applied to the preparation of other compounds in this series (Scheme 2). Compound **1h** was

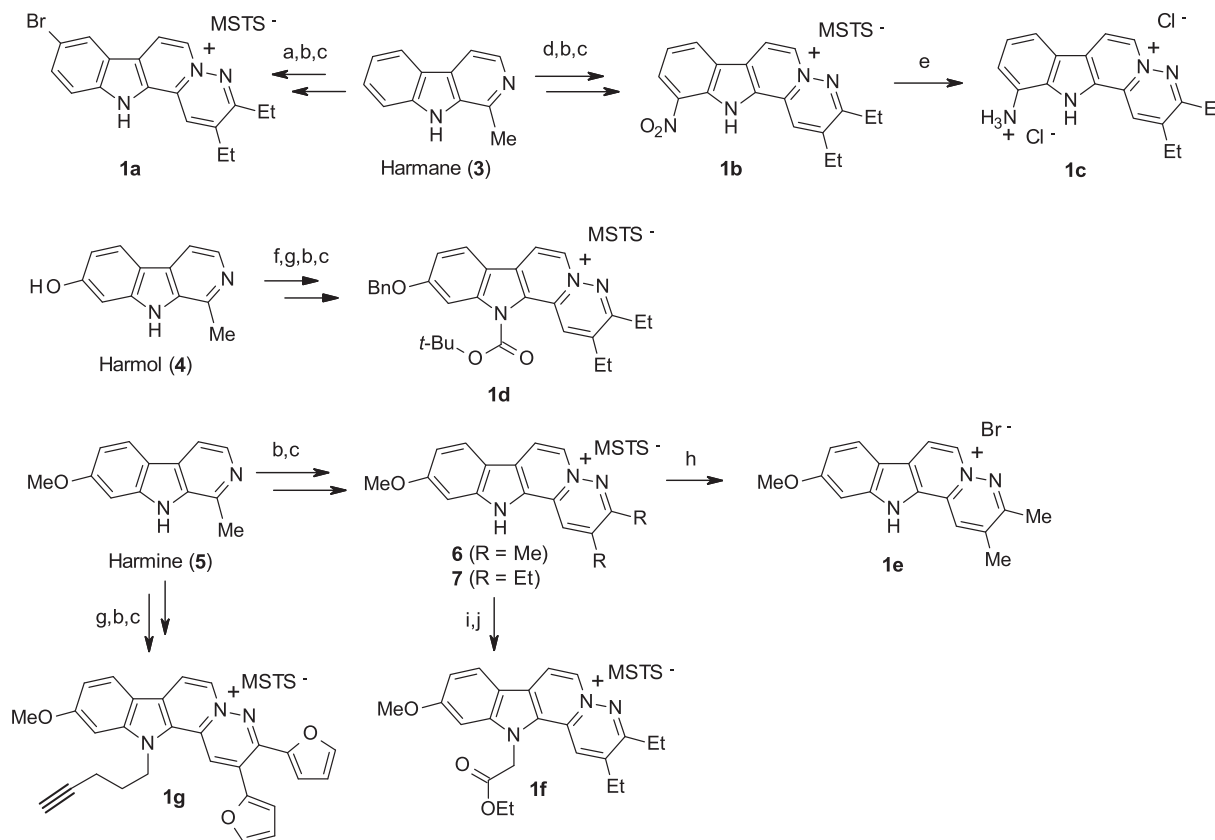
prepared by alkylation with 1,3-diiodopropane from **8**, which was synthesised as reported earlier (see SD) [18]. Compound **1i** was prepared by acidic hydrolysis of **1f**. Compound **9** was obtained by alkylation of harmine (**5**) using phase-transfer catalysis (PTC) conditions [20] followed by treatment with *O*-(mesitylsulfonyl) hydroxylamine (MSH) to give **10** (see SD). Subsequent basic condensation with acenaphthoquinone gave **1j**. Treatment of compound **9** with copper(II) acetate gave the dimeric compound **11**. Subsequent amination to give **12** followed by basic condensation with hexane-3,4-dione yielded **1k**.

The series of pyridazino[1,6-*a*]benzimidazolium salts **2** was prepared from 2-methyl-benzimidazole (**13**) in a reaction sequence that involved *N*-alkylation, *N*-amination, and basic condensation with acenaphthoquinone. Compounds **14** and **15** were prepared as reported previously [19,21]. Acidic hydrolysis provided **2a** and **2b**, respectively. The reaction of **2a** with thionyl chloride gave **16** [22], which was alkylated with 1,3-dibromopropane to give **17**. Subsequent treatment with *N,N,N,N*-tetramethyl-propane-1,3-diamine gave **2c** (Scheme 3).

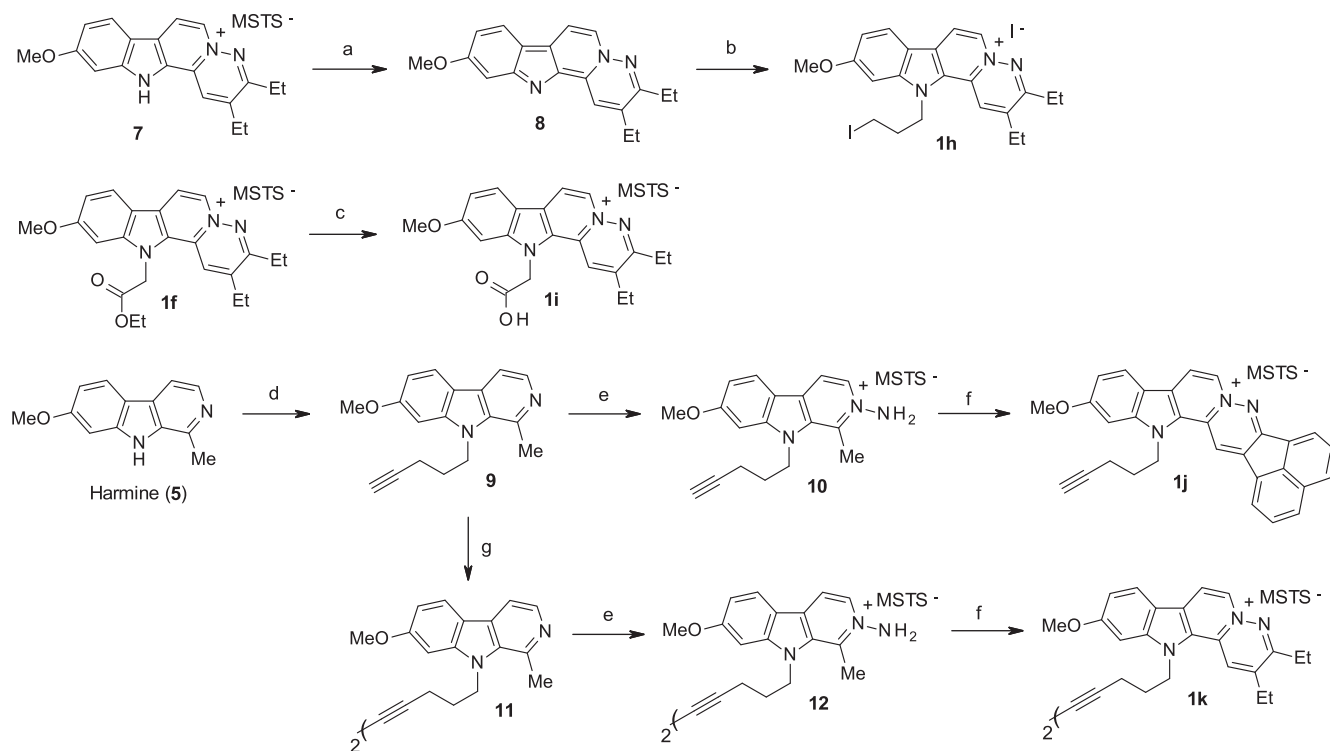
3. Results and discussion

3.1. Determination of THP-1 cell line viability in the presence of compounds **1** and **2**

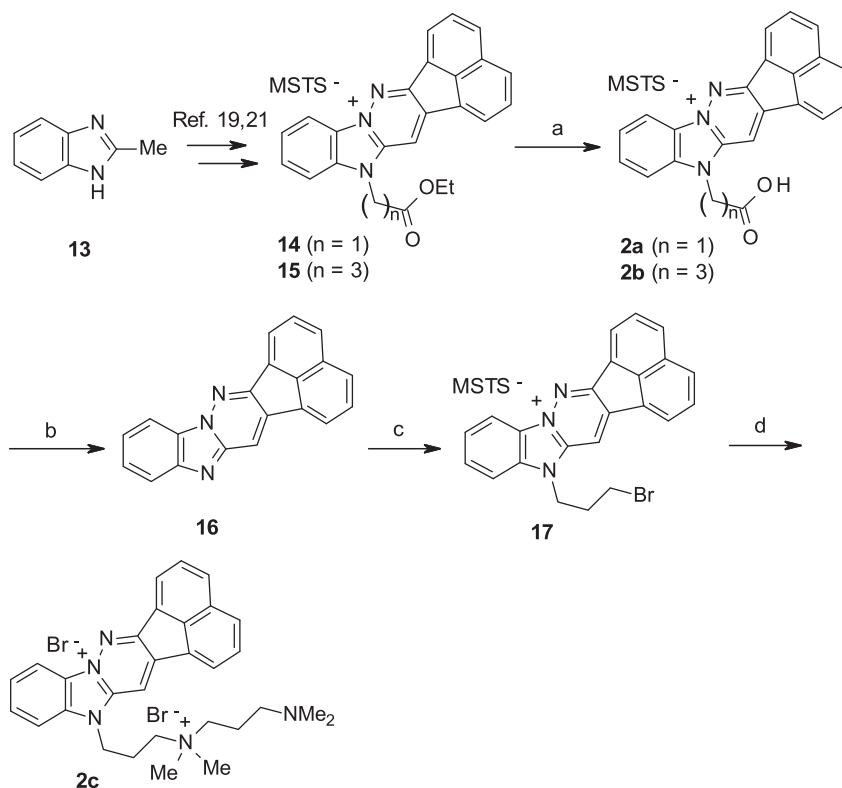
Monocytes and macrophages are the main producers of TNF- α . The human monocytic cell line THP-1 was used to explore the potential activity of compounds **1** and **2** as TNF- α synthesis inhibitors. Previous data showed the putative cytotoxic potential of indolinium and benzimidazolium derivatives [18,19]. The potential



Scheme 1. Synthetic pathway for compounds **1a–g**. Reagents and conditions (see SD and ref. 18): a) Br₂, THF; b) MSH, CH₂Cl₂; c) 1,2-diketone, Et₃N or AcONa, EtOH or acetone, reflux; d) HNO₃, 0 °C; e) SnCl₂, HCl, reflux; f) Boc₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂; g) RBr, KOH, K₂CO₃, BBDECl, MeCN; h) 48% HBr; i) Et₃N, H₂O; j) Ethyl bromoacetate, MeCN.



Scheme 2. Synthetic pathway for compounds **1h**–**1k**. *Reagents and conditions:* a) Et₃N, H₂O; b) 1,3-diiodopropane, 300 W, μ W, two runs; c) 48% HBr, reflux; d) 5-chloro-pent-1-yne, BBDECl, NaOH, K₂CO₃, MeCN; e) MSH, CH₂Cl₂; f) 1,2-diketone, CH₃CO₂Na, EtOH, reflux; g) Cu(AcO)₂, CH₃CN, reflux.



Scheme 3. Synthetic pathway for compounds **2a**–**2c**. *Reagents and conditions:* a) 48% HBr, reflux; b) **2a**, SOCl₂, reflux; c) 1,3-dibromopropane, 300 W, μ W; d) *N,N,N,N*-tetramethylpropane-1,3-diamine, DMF, 100 °C.

cytotoxicity of these newly synthesised molecules was analysed by incubating THP-1 cells for 24 h in the presence of each compound (10 μ M) and the cell viability was then assessed. Parallel cultures were established, in which cells were further stimulated with 100 ng/mL of LPS during the last 4 h to rule out the deleterious effect of an inflammatory challenge. Differences were not observed between cultures with and without LPS (data not shown). The cell viability of LPS-stimulated cells preincubated for 24 h with compounds **1** or **2** (10 μ M) is represented in Fig. 2.

3.2. In vitro inhibition assay of LPS-induced TNF- α production

The ability of the various compounds to modulate the production of TNF- α was first explored in THP-1 cells. Cells were pre-treated or left untreated overnight in the presence of increasing concentrations of each compound and were then further stimulated with LPS for 4 h. Preliminary experiments were performed in which one single dose of 10 μ M was analysed. Further experiments with increasing concentrations were performed only with those compounds that showed low toxicity (**1b**, **1c**, **1e**, **1f**, **1h**, **1i**, **2a**, **2b**). The results are summarised in Table 1.

3.3. Structure–activity relationships

Although the number of compounds synthesised and tested was small, several tentative relationships can be established for the cell viability and TNF- α production inhibition data. For series **1** (see Fig. 2 and Table 2), the presence of a 9-Br substituent in R made cells unviable (**1a**), although this was possibly a consequence of the labile nature of the bromo-substituent rather than the position itself. The presence of nitro, ammonium or short-chain alkoxy groups at positions C-10 or C-11 was relatively well tolerated (**1b**, **1c**, **1e**). In the R₁ substituent, the presence of an alkyne moiety was detrimental as compounds **1g**, **1j**, **1k** are highly toxic. Indeed, alkynes are well-known DNA-photocleaving agents [23] and terminal alkynes have recently been reported to be acceptors of the active-site cysteine nucleophile [24]. The presence of hydrogen and non-bulky short-chain ester or carboxylic acid groups was well tolerated (**1b**, **1c**, **1e**, **1f**, **1i** vs. **1d**) although a haloalkyl chain reduced viability (**1f**, **1i** vs. **1h**). A similar effect was also observed in series **2** (**2a**, **2b** vs. **2c**) and this was probably a consequence of the alkylating potential of **1h** and **2c**.

For compounds that showed cell viability above 50% (**1b**, **1c**, **1e**, **1f**, **1h**, **1i**, **2a**, **2b**; Tables 1 and 2), increasing concentrations were tested in order to calculate the IC₅₀ values. Compounds **1b**, **1c**, and **1i** did not show dose-dependent inhibition. Within series **1**, the

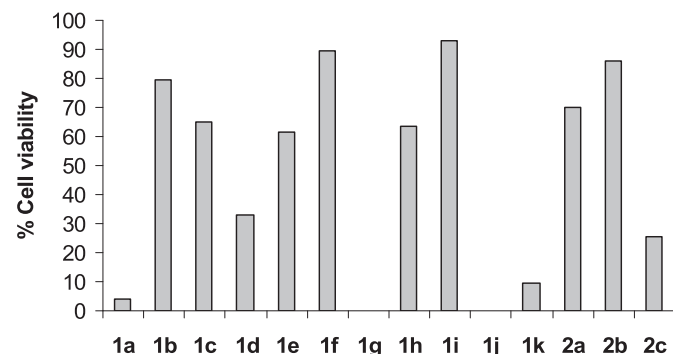


Fig. 2. Cell viability of LPS-stimulated cells preincubated with compounds **1** or **2** (10 μ M). THP-1 cells were incubated overnight in the presence of the indicated compounds followed by 4 h of stimulation with 100 ng/mL LPS. Cell line viability was evaluated by exclusion of propidium iodide as measured by flow cytometry.

Table 1

Inhibitory activity (% inhibition of TNF- α production) and toxicity (% cell viability) of compounds **1** and **2** in THP-1 cells.

N ^a	Compd.	Inhibition (%) vs. concentration (μ M) ^b							IC ₅₀ (μ M)	Cell viability (%) ^c
		0.1	1	5	10	25	50	100		
1	1a				89					3.76
2	1b		44	56	29	47				79.36
1	1c		13.3	–13.4	88					65.02
1	1d				94					33.05
9	1e	–0.97	34.9	63.4	87.8				4.49	61.27
3	1f		51	67	45	94			11.5	89.72
1	1g				87					0
2	1h		11	36	72	79			9.88	63.28
5	1i				38	29	35	40		93
1	1j				94					0
1	1k				34					9.54
3	2a	9	12	7	45	84			14.6	69.91
6	2b				19	47	70	85	39.2	86
2	2c				39					25.28

^a No. of experiments performed with each compound.

^b Inhibition of TNF- α production in response to 100 ng/mL LPS. Mean values corresponding to a number of independent experiments indicated in the left-hand column are shown.

^c % cell viability of cells incubated with 10 μ M of compounds plus 100 ng/mL LPS.

presence of a hydrogen substituent at R₁ (**1e**, IC₅₀ = 4.49 μ M) provided better inhibition than an ethoxycarbonylmethyl chain (**1f**, IC₅₀ = 11.5 μ M) or a 3-iodopropyl chain (**1h**, IC₅₀ = 9.88 μ M). Within series **2**, the presence of a shorter carboxyalkyl chain was preferred (**2a**, IC₅₀ = 14.6 μ M; **2b**, IC₅₀ = 39.2 μ M).

3.4. Inhibitory effect of **1e** in LPS-induced TNF- α production by THP-1 and primary human cells

Of the compounds analysed, **1e** showed the lowest IC₅₀ value in the monocytic cell line THP-1. As a consequence, we decided to test the ability of **1e** to downregulate TNF- α production by primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and purified human monocytes. As can be seen from Fig. 3, a dose-dependent inhibition of TNF- α production was observed in PBMCs and in human CD14⁺ monocytes as well as in THP-1 cells. The IC₅₀ values were calculated in PBMCs and human monocytes (Table 3).

3.5. Inhibitory effect of compound **1e** on poly I:C-induced TNF- α and IL-12 production by human monocytes and in vitro differentiated myeloid dendritic cells (DCs)

Poly I:C is a synthetically produced mimetic of viral RNA that is also able to stimulate the inflammatory response in monocytes,

Table 2

Substituents at positions R, R₁, and R₂ for compounds **1** and **2**.

Compd.	R	R ₁	R ₂
1a	9-Br	H	Et
1b	11-NO ₂	H	Et
1c	11-(NH ₃) ⁺	H	Et
1d	10-BnO	CO ₂ Bu ^t	Et
1e	10-MeO	H	Me
1f	10-MeO	CH ₂ CO ₂ Et	Et
1g	10-MeO	HCC(CH ₂) ₃	2-Furyl
1h	10-MeO	I(CH ₂) ₃	Et
1i	10-MeO	CH ₂ CO ₂ H	Et
1j	10-MeO	HCC(CH ₂) ₃	1,8-Dinaphthyl
1k	10-MeO	(CH ₂) ₃ CC(CH ₂) ₃	Et
2a	–	CH ₂ CO ₂ H	1,8-Dinaphthyl
2b	–	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	1,8-Dinaphthyl
2c	–	Me ₂ N(CH ₂) ₃ N ⁺ Me ₂ (CH ₂) ₃	1,8-Dinaphthyl

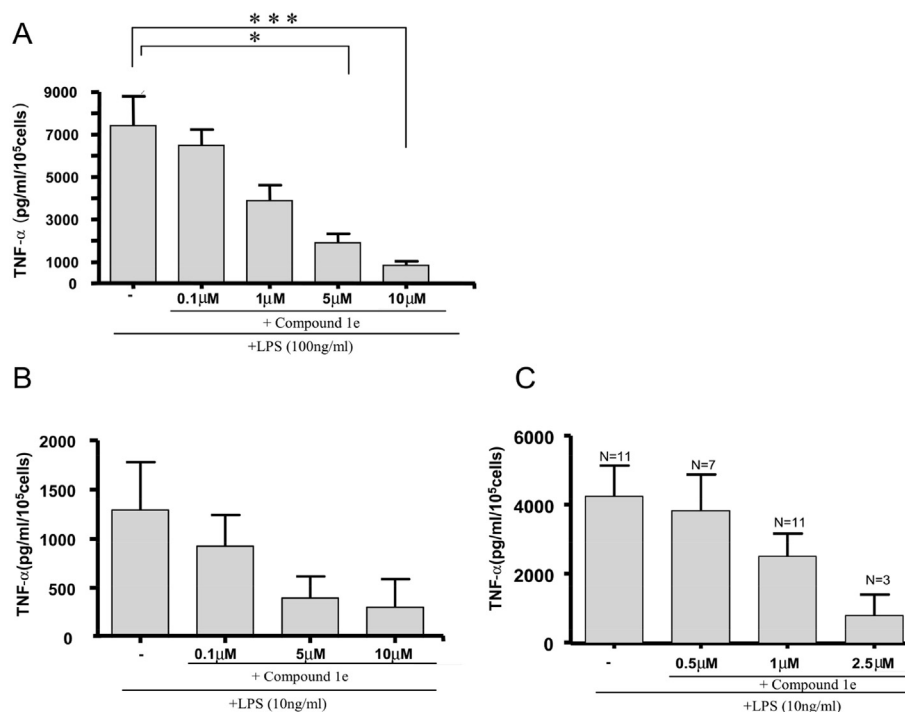


Fig. 3. Dose-dependent inhibition of TNF- α production by **1e**. (A) THP-1 cells; (B) human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); (C) CD14⁺ human monocytes. Cells were cultured overnight with increasing concentrations of **1e**, followed by LPS stimulation for 4 h. TNF- α production was quantified by ELISA in the culture supernatants. *P value < 0.05 and ***P < 0.001 (Kruskal–Wallis and Dunns post-test).

Table 3
Inhibition of TNF- α production by **1e** in human primary cells.

	1e (μM)						IC ₅₀ (μM)
	0.1	0.5	1	2.5	5	10	
% I (PBMCs) ^a	22.7	nd	38.8	nd	71.2	69.2	3.91
% I (monocytes) ^a	nd	28.56	38.15	56.41	nd	95.3	1.82

^a Inhibition of TNF- α production in response to 100 ng/mL LPS; nd. Not determined.

macrophages, and dendritic cells. The functional capability of **1e** to dampen inflammation triggered by various stimuli was assessed by pretreating human monocytes and monocyte-derived dendritic cells with **1e** and then challenging them with poly I:C. Fig. 4 shows that **1e** was able to inhibit the production of TNF- α triggered by poly I:C in monocytes and dendritic cells. Furthermore, pretreatment with low doses of **1e** was also able to inhibit the production of IL-12 in poly I:C stimulated DCs.

3.6. Inhibition of TNF- α transcription by **1e** in human monocytes

Transcriptional and post-transcriptional mechanisms are involved in regulating the production of TNF- α by immunocytes. Real-time RT-PCR studies were performed to explore whether **1e** was able to inhibit the expression of TNF- α at the transcriptional level. Fig. 5 shows that LPS induction of TNF- α mRNA was almost completely abrogated in monocytes pretreated with 1 μM of **1e**.

3.7. In vivo anti-inflammatory activity of **1e**

Previous data demonstrate the inhibitory effect of **1e** *in vitro*. The efficacy of the compound administered *in vivo* was investigated by administering two doses of **1e** (2 mg/kg) intraperitoneally to C57BL/6 mice at an interval of 18 h. The animals were sacrificed 4 h

after the second dose. The spleen cells were then isolated and cultured *in vitro* in the presence or absence of LPS. The production of TNF- α was measured in the culture supernatants by flow cytometry CBA. LPS significantly stimulated the production of TNF- α in cells from vehicle-treated mice, but it was no longer able to stimulate a significant increase in TNF- α production by splenocytes when mice had been injected with **1e**. As a result, the release of TNF- α in response to LPS was significantly reduced in cells from treated mice compared to the control group (Fig. 6). These data strongly suggest that *in vivo* administration of **1e** was able to reduce the response of immune cells to a strong proinflammatory stimulus such as LPS.

4. Conclusions

In summary, 14 compounds were prepared and their toxicity and ability to dampen the inflammatory response was evaluated by measuring the inhibition of the production of the pleiotropic cytokine TNF- α . Several derivatives showed inhibitory activity, but **1e** was selected for further study based on its low toxicity and efficacy at a low concentration (IC₅₀ = 4.49 μM) in THP-1 cells. Moreover, compound **1e** was even more potent in isolated human monocytes (IC₅₀ = 1.82 μM) and proved to be effective *in vivo*. In addition to inhibiting inflammatory signals delivered by a bacterial component such as LPS, compound **1e** also downregulated the production of proinflammatory cytokines in response to a viral-mimicking stimulus such as poly I:C, which is an analogue of viral ssRNA. Furthermore, this compound not only downregulated TNF- α production by macrophages, but was also able to inhibit the production of a founder proinflammatory cytokine such as IL-12 by stimulated dendritic cells. The experimental data suggest that **1e** could be a potential therapeutic agent in IMIDs, for which anti-TNF drugs have been successfully used, as well as for other diseases such as immune reconstitution syndrome, in which additional cytokines

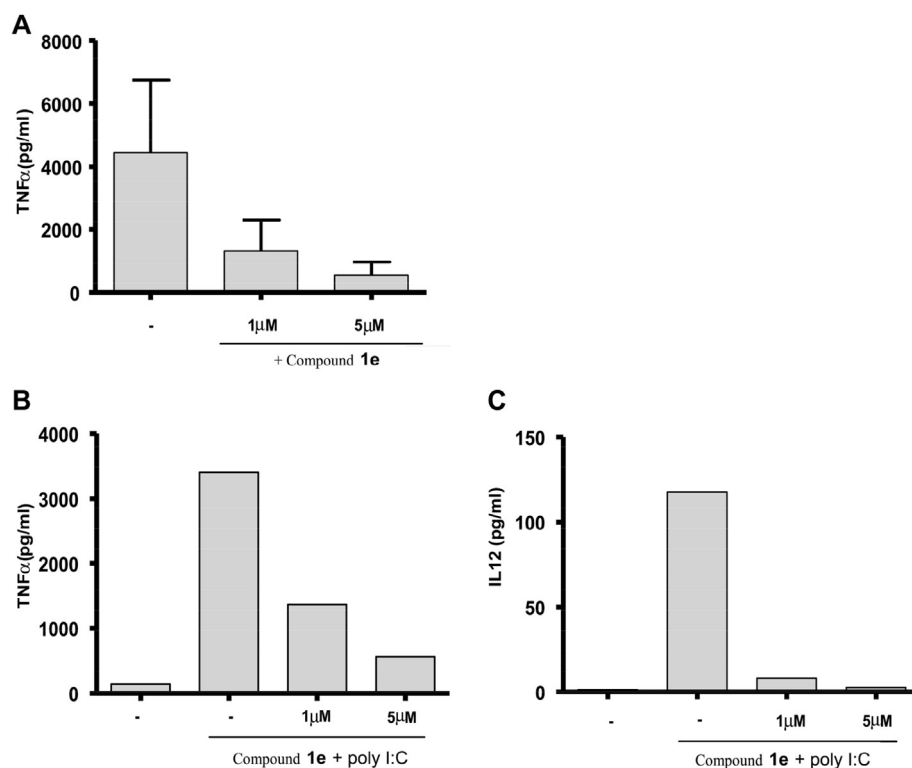


Fig. 4. Inhibition of TNF- α production by **1e**. (A) Purified human monocytes; (B,C) monocyte-derived dendritic cells. Cells were pretreated for 1 h with **1e** at various concentrations followed by overnight poly I:C stimulation. TNF- α and IL-12 production were quantified by ELISA and CBA, respectively, in the culture supernatants. Mean \pm SEM values of three independent experiments are shown in A.

may exacerbate the patients' response, or conditions in which inflammatory macrophages may play a role, such as metabolic syndromes.

5. Experimental section

5.1. Chemistry

Solvents (HPLC quality, Scharlab) were dried in a Solvent Purification System (MBraun) by passage through a pre-activated

alumina column or they were purchased as anhydrous quality. Reagents were purchased from Sigma–Aldrich and were used as received. The reactions involving moisture-sensitive compounds

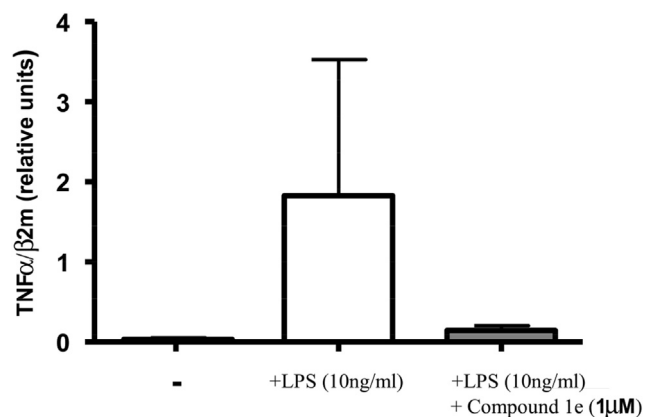


Fig. 5. Inhibition of TNF- α transcription by **1e** in human monocytes. The expression of TNF- α in response to LPS stimulation 10 ng/mL (2 h) was measured by real-time RT-PCR in purified CD14⁺ human monocytes pretreated overnight with **1e** (1 μ M) or left untreated. TNF- α mRNA molecules were normalised to β 2-microglobulin mRNA, which was used as a reference gene. Mean \pm SEM values corresponding to 3 independent experiments are shown.

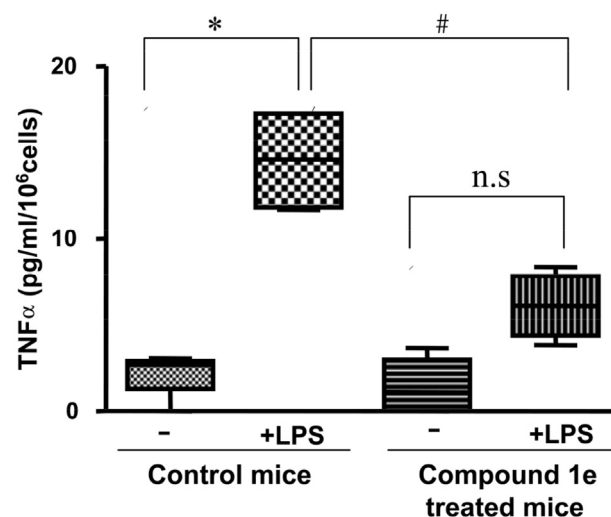


Fig. 6. Analysis of the efficacy of **1e** *in vivo*. Splenocytes from mice treated intraperitoneally with two doses (2 mg/kg) of **1e** or vehicle were isolated and cultured *in vitro* in the presence or absence of 10 ng/mL LPS for 4 h and the secretion of TNF- α was evaluated by CBA. Box plots represent values in culture supernatants from 4 mice in each group. The horizontal middle lines represent the median, the top and bottom lines represent the quartile values, and the T-bars represent the maximum and minimum values. The Wilcoxon matched pair test was used to analyse data obtained within the same group (* p = 0.0156 control vs. LPS; n.s.: not significant). The Mann–Whitney U test was applied to compare data from **1e** and vehicle-treated mice (# p = 0.0205 vehicle + LPS vs. Compound **1e** + LPS).

were performed under an atmosphere of dry argon. Microwave-assisted reactions were carried out in a 5 mL vial using a Synthesizer 402 microwave synthesizer (Prolabo). The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica-coated aluminium sheets (60F₂₅₄ Alugram) and chromatograms were visualised with UV light (254 or 366 nm). Purification by column chromatography was undertaken with Merck silica gel (0.030–0.075 mm) and the solvents were used as received (Scharlab). Infrared spectra (IR, KBr window) were recorded on a Perkin–Elmer FTIR 1725X instrument. The frequencies (ν) of the most intense bands are given in cm⁻¹. Nuclear magnetic resonance spectra (¹H and ¹³C NMR) were recorded using Varian Mercury-VX-300 MHz (300 and 75 MHz, respectively) and Varian-UNITYPLUS-500 (500 and 125 MHz, respectively) instruments. Chemical shifts (δ) are given in ppm and are referenced to the residual signal of the non-deuterated solvent. Coupling constants (*J*) are given in Hz. The abbreviations s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, t = triplet, td = triplet of doublets, q = quadruplet, m = multiplet, bs = broad signal, appt = apparent triplet are used throughout. Elemental analyses (C, H, N) were carried out on a Heraeus CHN Rapid Elemental Analyzer and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values.

The [supplementary data](#) contains experimental procedures and characterisation data for compounds **1a–d**, **1f–g**, **16** and their intermediates. ¹H and ¹³C NMR spectra for **1e** and its intermediates are also provided as representative examples. The synthesis of new compounds **1e**, **1h–k** and **2a–c** is described below.

5.1.1. 2,3-Dimethyl-12H-10-methoxy-pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-5-inium bromide (**1e**)

A solution of **6** (see SD) (51 mg, 0.1063 mmol) in 48% HBr (2 mL) was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dried under a vacuum. The solid was treated with Et₂O in an ultrasound bath and the mixture was filtered. Compound **1e** was obtained as a yellow solid and this was recrystallized from ethanol/acetic acid. Yield: 31%; mp: >280 °C (dec.); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 9.09 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 8.78 (s, 1H), 8.67 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 8.32 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.29 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.17 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz, *J* = 2.2 Hz), 4.03 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.73 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 164.4, 162.1, 146.4, 139.6, 131.7, 131.2, 130.2, 128.6, 127.8, 127.3, 124.4, 117.0, 115.7, 114.8, 100.9, 95.5, 56.4, 20.7, 19.4. HRMS [ESI-TOF]: Calcd for C₁₇H₁₆N₃O, [M⁺]: 278.1286. Found [M⁺]: 278.1288. Anal. (C₁₇H₁₆BrN₃O) theoretical: C, 57.00; H, 4.50; N, 11.73. Found: C, 57.27; H, 4.82; N, 11.38.

5.1.2. 2,3-Diethyl-10-methoxy-12-(3-iodopropyl)-pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-5-inium iodide (**1h**)

A slurry of **8** (see SD) (86.8 mg, 0.3 mmol) in 1,3-diiodopropane (5 mL) was irradiated in a microwave synthesizer for 10 min ($\times 2$) at 300 W. The solid was filtered when the mixture was still hot and was washed with acetone (2 \times 5 mL) and Et₂O (2 \times 5 mL). Crystallization from ethanol yielded **1h** as an orange solid. Yield: 55%; mp: >300 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.18 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 9.04 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 8.87 (s, 1H), 8.37 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.20 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 5.19 (bs, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.35 (bs, 2H), 2.97 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.90 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.59 (bs, 2H), 1.40 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz). Anal. (C₂₂H₂₅N₃OI₂) theoretical: C, 43.95; H, 4.19; N, 6.99. Found: C, 44.27; H, 4.42; N, 7.17.

5.1.3. 12-Carboxymethyl-2,3-diethyl-10-methoxy-pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-5-inium bromide (**1i**)

A mixture of **1f** (see SD) (38.7 mg, 0.08 mmol) and 48% HBr (1 mL) was heated under reflux for 3 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was treated with Et₂O to

give **1i** as an orange solid. Yield: 85%; mp: 234–235 °C (ethanol/Et₂O); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.33 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 8.90 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 8.58 (s, 1H), 8.47 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.68 (s, 1H), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 5.96 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.15 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.99 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.39 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz). Anal. (C₂₁H₂₂N₃O₃Br·H₂O) theoretical: C, 54.55; H, 5.23; N, 9.09. Found: C, 55.72; H, 5.60; N, 8.77.

5.1.4. 14-Methoxy-16-(pent-4-ynyl)acenaphtho[1'',2'':3',4']pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-9-inium mesitylsulfonate (**1j**)

A mixture of **10** (see SD) (0.10 g, 0.2 mmol), acenaphthoquinone (0.036 g, 0.2 mmol), anhydrous sodium acetate (0.016 g, 0.2 mmol) and ethanol (10 mL) was heated under reflux for 1 h. The solid was filtered when the mixture was still hot and was washed with hot ethanol (5 mL) and hot acetone (5 mL). Crystallization from acetic acid/acetone gave **1j** as an orange solid. Yield: 67%; mp: 273–274 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.55 (s, 1H), 9.37 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 8.75 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 8.71 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 8.58 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 8.38 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.34 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 8.02 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.52 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.18 (dd, 1H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.2 Hz), 5.24 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 4.05 (s, 3H), 2.75 (s, 1H), 2.54–2.51 (m, 2H), 2.38–2.29 (m, 2H); IR (KBr): ν 2932, 1621, 1574, 1544, 1409, 1250, 1223, 1161, 829, 678; Anal. (C₃₉H₃₃N₃O₄S·2H₂O) theoretical: C, 69.31; H, 5.52; N, 6.22. Found: C, 69.07; H, 5.19; N, 5.91.

5.1.5. 1,10-Bis-(1-methyl-7-methoxy-pyrido[3,4-b]indol-9-yl)-deca-4,6-diyne (**1l**)

A mixture of **9** (see SD) (0.26 g, 1 mmol) and copper(II) acetate (0.90 g, 5 mmol) in acetonitrile (20 mL) was heated under reflux for 48 h. Water (10 mL) and 25% ammonia (5 mL) were added. The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (30 mL) and the organic phase was dried (MgSO₄) and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was chromatographed on silica gel using acetone/ethanol (8:2) as eluent. Crystallization from acetone gave **1l** as a pale yellow solid. Yield: 45%; mp: 184–185 °C; ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ 8.9 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.74 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz), 6.89 (d, 2H, *J* = 2.2 Hz), 6.89 (dd, 2H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.2 Hz), 4.64 (t, 4H, *J* = 7.3 Hz), 3.94 (s, 6H), 3.04 (s, 6H), 2.38 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz), 2.13–2.04 (m, 4H); IR (KBr): ν 2966, 2115, 1617, 1558, 1414, 1238, 1108, 839, 675 cm⁻¹; Anal. (C₃₆H₃₄N₄O₂) theoretical: C, 77.95; H, 6.18; N, 10.10. Found: C, 77.71; H, 6.33; N, 9.84.

5.1.6. 9,9'-(Deca-4,6-diyne-1,10-diyl)-bis-(2-amino-1-methyl-7-methoxy-pyrido[3,4-b]indol-2-inium) dimesitylenesulfonate (**12**)

A solution of MSH (0.30 g, 1.4 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was added dropwise to a slurry of **11** (0.55 g, 1 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) at room temperature. After 1 h, Et₂O was added and the resulting solid was filtered and washed with acetone and CH₂Cl₂. Crystallization from ethanol gave **12** as a white solid. Yield: 90%; mp: 250–251 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.54 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz), 8.43 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz), 8.30 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz), 7.67 (s, 4H), 7.35 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz), 7.05 (dd, 2H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 1.8 Hz), 4.70 (t, 4H, *J* = 7.3 Hz), 3.94 (s, 6H), 3.13 (s, 6H), 2.47–2.43 (m, 4H), 2.02–1.97 (m, 4H); IR (KBr): ν 3432, 3252, 3139, 2934, 2328, 1624, 1573, 1456, 1249, 1228, 1167, 1085, 1014, 816, 679; Anal. (C₅₄H₆₀N₆O₈S₂) theoretical: C, 65.83; H, 6.14; N, 8.53. Found: C, 65.57; H, 6.22; N, 8.40.

5.1.7. 12,12'-(Deca-4,6-diyne-1,10-diyl)-bis-(2,3-diethyl-10-methoxy-pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-5-inium) dimesitylenesulfonate (**1k**)

A mixture of **12** (0.10 g, 0.1 mmol), hexane-3,4-dione (0.025 g, 0.2 mmol), anhydrous sodium acetate (0.008 g, 0.1 mmol) and

ethanol (10 mL) was heated under reflux for 24 h. The mixture was evaporated to dryness and the residue was treated with a mixture of acetone/Et₂O. The solid was filtered, washed with cold water (1 mL) and dried under vacuum to give **1k** as a yellow solid. Yield: 52%; mp: 292–293 °C (ethanol); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 9.10 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz), 8.73 (s, 2H), 8.64 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz), 8.28 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.20 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz), 7.13 (dd, 2H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.2 Hz), 5.73 (t, 4H, *J* = 7.5 Hz), 3.99 (s, 6H), 3.16 (q, 4H, *J* = 7.3 Hz), 3.05 (q, 4H, *J* = 7.3 Hz), 2.48–2.45 (m, 4H), 2.25–2.18 (m, 4H), 1.51–1.45 (m, 12H); IR (KBr): ν 2954; 1619; 1558; 1414; 1202; 1178; 1085; 679; Anal. (C₆₆H₇₂N₆O₈S₂·1H₂O) theoretical: C, 68.37; H, 6.43; N, 7.25. Found: C, 68.04; H, 6.69; N, 7.43.

5.1.7.1. General procedure for ester hydrolysis. A mixture of ester **14** or **15** [19] (1 mmol) and 48% HBr (5 mL) was heated under reflux for 2 h. The cooled mixture was filtered and the solid was washed with acetone (2 × 10 mL) and crystallized.

5.1.8. 9-Carboxymethylacenaphtho[1',2':3,4]pyridazine[1,6-a]benzimidazol-14-inium bromide (2a)

Yellow solid. Yield: 93%; mp: 298–300 °C (ethanol/acetone); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.73 (s, 1H), 8.56–8.48 (m, 3H), 8.38–8.28 (m, 3H), 8.04–7.94 (m, 3H), 7.86 (appt, 1H, *J* = 7.6 Hz), 5.85 (s, 2H); IR (KBr): ν 3378, 3016, 2907, 2766, 2548, 1752, 1729, 1611, 1528, 1467, 1413, 1374, 1338, 1286, 1215, 1099, 825, 773, 751; Anal. (C₂₂H₁₄N₃O₂Br·1/2H₂O) theoretical: C, 60.12; H, 3.26; N, 9.72. Found: C, 59.87; H, 3.42; N, 9.52.

5.1.9. 9-(3-Carboxypropyl)acenaphtho[1',2':3,4]pyridazine[1,6-a]benzimidazol-14-inium bromide (2b)

Yellow solid. Yield: 94%; mp: 299–300 °C (ethanol/acetone); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.74 (s, 1H), 8.62 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 8.56 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.41 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.40 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.32 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.06–8.00 (m, 2H), 7.97 (appt, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.86 (appt, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.90 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.51 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.28–2.20 (m, 2H); IR (KBr): ν 3380, 2960, 1722, 1629, 1607, 1528, 1419, 1401, 1299, 1205, 1180, 1100, 830, 762; Anal. (C₂₄H₁₈N₃O₂Br·3/2H₂O) theoretical: C, 59.15; H, 4.34; N, 8.62. Found: C, 59.17; H, 4.35; N, 9.01.

5.1.10. 9-(3-Bromopropyl)acenaphtho[1',2':3,4]pyridazino[1,6-a]benzimidazol-14-inium bromide (17)

A slurry of **16** (see SD) (0.06 g, 0.2 mmol) in 1,3-dibromopropane (2.01 g, 10 mmol) was heated by microwave irradiation for 10 min at 300 W. The precipitate was filtered when the mixture was still hot and was washed with acetone. The solid was crystallized from ethanol to give **17**. Yield: 90%; mp: 231–233 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.70 (s, 1H), 8.66–8.57 (m, 3H), 8.44 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 8.33 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.10–8.03 (m, 2H), 7.97 (appt, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 7.3 Hz), 7.87 (appt, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.3 Hz), 4.97 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.67 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.55–2.50 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 153.2, 140.3, 139.5, 136.8, 132.5, 132.0, 131.9, 130.6, 130.5, 130.4, 130.4, 129.8, 129.2, 128.9, 127.1, 126.1, 124.2, 114.0, 113.9, 112.0, 40.6, 32.7, 32.7, 31.3; IR (KBr): ν 3416, 2941, 2892, 1628, 1610, 1529, 1480, 1425, 1245, 1165, 1098, 1034, 817, 778, 750, 636; Anal. (C₂₃H₁₇N₃Br₂·1H₂O) theoretical: C, 53.82; H, 3.73; N, 8.18. Found: C, 53.90; H, 3.81; N, 8.26.

5.1.11. 9-(4,4,8-Trimethyl-8-aza-4-azonium-nonanyl)acenaphtho[1',2':3,4]pyridazino[1,6-a]benzimidazol-14-inium dibromide (2c)

A mixture of **17** (0.19 g, 0.4 mmol) and *N,N,N,N*-tetramethylpropane-1,3-diamine (0.025 g, 0.2 mmol) in DMF (20 mL) was heated at 90–100 °C for 72 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residual solid was chromatographed on silica gel using methanol/dichloromethane (10:1) as an eluent to

give **2c** as a pale yellow solid. Yield: 46%; mp: >300 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.28 (s, 1H), 8.78 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 8.58 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz), 8.47–8.41 (m, 3H), 8.06–7.96 (m, 3H), 7.88 (appt, 2H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 7.2 Hz), 5.04 (bs, 2H), 3.68–3.78 (m, 2H), 3.47–3.34 (m, 2H), 3.09 (s, 6H), 3.05 (bs, 2H), 2.79 (s, 6H), 2.79–2.68 (m, 2H), 2.28–2.16 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.0, 144.8, 139.4, 138.1, 135.4, 131.1, 130.9; 130.7; 129.3; 129.2; 129.1; 129.0; 127.8; 127.6; 125.9; 125.1; 123.0; 114.0; 113.0; 112.7, 49.9, 46.2, 45.2, 41.3, 26.1, 21.7, 19.3, 19.1, 17.3; IR (KBr): ν 3419, 3013, 1611, 1529, 1467, 1099, 1036, 828, 760; Anal. (C₃₀H₃₅N₅Br₂·2H₂O) theoretical: C, 54.47; H, 5.94; N, 10.59. Found: C, 54.73; H, 5.83; N, 10.70.

5.2. Biological assays

5.2.1. Cell line, human primary cells and reagents

The human promonocytic cell line THP-1 was grown in RPMI-1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 5% (v/v) heat-inactivated FCS (HyClone, Cramlington, UK).

PBMCs were isolated from healthy donors by Ficoll/Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation and were cultured in RPMI-1640 plus 10% FCS. CD14⁺ cells were purified from PBMCs using CD14 human Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). Flow cytometry analysis of isolated PMBCs and monocytes showed that cell purity was at least 95%. To induce differentiation into immature DCs, CD14⁺ cells were cultured in the presence of recombinant human GM-CSF (500 U/mL) and recombinant human IL-4 (100 U/mL) (PeproTech, London, UK). After 3 days of culture, fresh medium containing GM-CSF and IL-4 was added, and the incubation was prolonged for 2 days. Differentiation was assessed by flow cytometry analysis of specific markers (loss of CD14, and acquisition of CD23 and CD1a).

LPS and propidium iodide were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). LPS was dissolved in PBS. Newly synthesised compounds were dissolved in DMSO as 100 mM stock solutions and these were stored at –20 °C.

5.2.2. Cell treatment, viability and cytokine determination

THP-1 cells were incubated for 24 h in RPMI-1640 plus 5% FBS and 10 μM of the various compounds. Duplicate cultures were stimulated with 100 ng/mL LPS during the last 4 h. Cell viability was measured in each case by flow cytometry through the determination of the percentage exclusion of propidium iodide (0.5 μg/mL). Cells were analysed in a FACScalibur cytofluorometer using CellQuestPro software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA).

The production of TNF-α was quantified in culture supernatants of cells incubated for 24 h in the presence of increasing concentrations of the selected compounds and stimulated with 100 ng/mL LPS (THP-1 cell line) or 10 ng/mL LPS (primary cells) during the last 4 h. Poly I:C (10 μg/mL) stimulation was carried out overnight. Cell-free supernatants were collected and the cytokine content was evaluated by using the Human TNF ELISA Set (BD Bioscience) according to the manufacturer's instructions. A standard curve was prepared with known concentrations of human TNF-α. Optical density (OD_{450nm}) was measured in a Synergy4 plate reader and results were analysed using Gen5 software (BioTek).

The percentage inhibition was calculated as 100 – ([TNF (pg/mL) in the presence of compound/maximum of TNF (pg/mL)] × 100). Linear regression was used to calculate the IC₅₀ value for each cell population.

The concentration of IL-12 in the supernatant of poly I:C stimulated DCs was measured by flow cytometry using the human IL-12 Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set kit (BD, Biosciences, CA) according to the manufacturer's instructions.

5.2.3. Quantitative RT-PCR analysis of TNF- α gene expression

Isolated CD14⁺ human monocytes were incubated overnight in the presence of compound **1e** (1 μ M) or vehicle and stimulated with LPS (10 ng/mL) during an extended period of 2 h. After this time, cells were harvested, total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation kit (Roche, Indianapolis, IN, USA), and reverse-transcribed with random hexamers and avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase (Roche, Indianapolis, IN, USA) in a final volume of 20 μ L for 1 h at 42 °C. TNF- α and β 2-microglobulin mRNA expression were quantified by real-time PCR in a Light Cycler (Roche, Indianapolis, IN) with FastStart DNA Master SYBR Green (Roche, Indianapolis, IN). Primers used were as follows: 5'-GAA AGG ACA CCA TGA GCA CTG-3' and 5'-TGA TTA GAG AGA GGT CCC TGG-3' for TNF- α and 5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3' and 5'-GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG-3' for β 2-microglobulin. Standard curves for TNF- α and β 2-microglobulin mRNA quantification were generated by amplifying 10-fold serial dilutions of known quantities of the specific PCR products. Relative units estimated from the quantification represent the ratio of TNF- α mRNA molecules to β 2-microglobulin mRNA molecules in the same cDNA sample.

5.2.4. In vivo assay

Female C57BL/6 mice (Charles River, Barcelona, Spain) were used for *in vivo* studies. Animals were housed in ventilated cages to minimise contact with pathogens. Mice weighing about 20 gr and 8–9 weeks old were treated by intraperitoneal injection with 2 doses of compound **1e** (2 mg/kg) dissolved in 200 μ L of saline solution at 18 h intervals. Control animals received a similar volume of vehicle in saline solution. Four hours after the second dose, the mice were sacrificed and the spleens were removed. Splenocytes were prepared by mechanical dissociation. Single cell suspensions were obtained after filtration through a 70 μ M cell strainer (BD). Splenocytes from **1e**-treated and control vehicle-treated mice were counted and cultured at 10⁶ cells/mL in RPMI-1640/5% FBS. Duplicate cultures were stimulated with 10 ng/mL LPS during 4 h and secreted TNF- α was measured in cell free culture supernatants using the murine TNF- α Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set kit (BD, Biosciences, CA).

Acknowledgements

The work described in this paper was partially supported by grants SAF 2010/19867 (Spanish Ministerio de Economía y Competitividad) to T.B.; FIS 09/00641, REDinREN 2.0 FEDER and Reina Sofia Institute of Nephrology Research (IRSIN) monetary funds to R.S.; CTQ2011-24715 (Spanish Ministerio de Economía y Competitividad) and REDinREN RD12/0021/0014 (Instituto de Salud Carlos III) to J.J.V., and a fellowship to P.S.-A. (University of Alcalá). The authors would like to thank Juliette Siegfried and her team at ServingMed.com for their editing of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.060>.

References

[1] D. Robinson Jr., M. Hackett, J. Wong, A.B. Kimball, R. Cohen, M. Bala, Co-

- occurrence and comorbidities in patients with immune-mediated inflammatory disorders: an exploration using US healthcare claims data, 2001–2002, *Curr. Med. Res. Opin.* 22 (2006) 989–1000.
- [2] T. Kawai, S. Akira, Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 460–469.
- [3] F. Balkwill, B. Foxwell, F. Brennan, TNF is here to stay!, *Immunol. Today* 21 (2000) 470–471.
- [4] A. Kuek, B.L. Hazleman, A.J. Ostor, Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution, *Postgrad. Med. J.* 8 (2007) 251–260.
- [5] H. Tilg, A.R. Moschen, Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 772–783.
- [6] P. Dandona, A. Aljada, A. Bandyopadhyay, Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes, *Trends Immunol.* 25 (2004) 4–7.
- [7] M. Saghizadeh, J.M. Ong, W.T. Garvey, R.R. Henry, P.A. Kern, The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1111–1116.
- [8] K.T. Uysal, S.M. Wiesbrock, M.W. Marino, G.S. Hotamisligil, Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function, *Nature* 389 (1997) 610–614.
- [9] L.C. Silva, L.C. Ortigosa, G. Benard, Anti-TNF-alpha agents in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: mechanisms of action and pitfalls, *Immunotherapy* 2 (2010) 817–833.
- [10] L. Hsu, B.T. Snodgrass, A.W. Armstrong, Antidrug antibodies in psoriasis: a systematic review, *Br. J. Dermatol.* 170 (2014) 261–273.
- [11] M.A. Palladino, F.R. Bahjat, E.A. Theodorakis, L.L. Moldawer, Anti-TNF- α Therapies: the next generation, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 736–746.
- [12] P.L. Toogood, Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 1543–1558.
- [13] T. Berg, Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42 (2003) 2462–2481.
- [14] K.S. Kumar, P.M. Kumar, K.A. Kumar, M. Sreenivasulu, A.A. Jafar, D. Rambabu, G.R. Krishna, C.M. Reddy, R. Kapavarapu, K. Shivakumar, K.K. Priya, K.V.L. Parsa, M. Pal, A three-component reaction: green synthesis of novel isoindolo[2,1-a]quinazoline derivatives as potent inhibitors of TNF- α , *Chem. Commun.* 47 (2011) 5010–5012.
- [15] K.S. Kumar, P.M. Kumar, M.A. Reddy, Md Ferozuddin, M. Sreenivasulu, A.A. Jafar, G.R. Krishna, C.M. Reddy, D. Rambabu, K.S. Kumar, S. Pal, M. Pal, Y(OTf)₃ catalyzed new cascade reaction: a facile assembly of fused quinazolinones, *Chem. Commun.* 47 (2011) 10263–10265.
- [16] D.S.-H. Chan, H.-M. Lee, F. Yang, C.-M. Che, C.C.L. Wong, R. Abagyan, C.-H. Leung, D.-L. Ma, Structure-based discovery of natural-product-like TNF- α inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 2860–2864.
- [17] M.M. He, A.S. Smith, J.D. Oslob, W.M. Flanagan, A.C. Braisted, A. Whitty, M.T. Cancilla, J. Wang, A.A. Lugovskoy, J.C. Yoburn, A.D. Fung, G. Farrington, J.K. Eldredge, E.S. Day, L.A. Cruz, T.G. Cachero, S.K. Miller, J.E. Friedman, I.C. Choong, B.C. Cunningham, Small-molecule inhibition of TNF- α , *Science* 310 (2005) 1022–1025.
- [18] A. Fontana, E.J. Benito, M.J. Martín, N. Sánchez, R. Alajarin, J.J. Vaquero, J. Álvarez-Builla, S. Lambel-Giraudet, S. Leonce, A. Pierré, D. Caignard, Synthesis and cytotoxic activity of pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-5-inium derivatives as anti-cancer agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 2611–2614.
- [19] J. Pastor, J. Siro, J.L. García-Navío, J.J. Vaquero, J. Álvarez-Builla, F. Gago, B. de Pascual-Teresa, M. Pastor, M.M. Rodrigo, Azino-fused benzimidazolium salts as DNA intercalating agents, *J. Org. Chem.* 62 (1997) 5476–5483.
- [20] J. Álvarez-Builla, J.J. Vaquero, J.L. García-Navío, J.F. Cabello, C. Sunkel, M. Faude Casa Juana, F. Dorrego, L. Santos, 1,5-bis-[N-benzyl-N,N-diethylamonio]-3-oxapentane dichloride, a novel bis-ammonium salt as phase transfer catalyst, *Tetrahedron* 46 (1990) 967–978.
- [21] J. Pastor, J. Siro, J.L. García-Navío, J.J. Vaquero, M.M. Rodrigo, M. Ballesteros, J. Álvarez-Builla, Synthesis of new azino fused benzimidazolium salts. A new family of DNA intercalating agents I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5 (1995) 3043–3048.
- [22] J. Siro, J. Pastor, J.L. García-Navío, J.J. Vaquero, J. Álvarez-Builla, Unexpected N-C bond fission of fused N-alkylbenzimidazolium salts. A new approach to pyrido[1,2-a]- or pyridazino[1,6-a]benzimidazoles, *Tetrahedron* 54 (1998) 1929–1936.
- [23] R.L. Funk, E.R.R. Young, R.M. Williams, M.F. Flanagan, T.L. Cecil, Photochemical cycloaromatization reactions of ortho-dialkynylarenes. A new class of DNA photocleaving agents, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 3291–3292.
- [24] R. Ekkebus, S.I. van Kasteren, Y. Kulathu, A. Scholten, I. Berlin, P.P. Geurink, A. de Jong, S. Goerdal, J. Neefjes, A.J.R. Heck, D. Komander, H. Ova, On terminal alkynes that can react with active-site cysteine nucleophiles in proteases, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 2867–2870.